



21 Aktenzeichen: 199 48 049.4  
22 Anmeldetag: 27. 9. 1999  
43 Offenlegungstag: 7. 12. 2000

66 Innere Priorität:  
299 08 807. 3 19. 05. 1999

71 Anmelder:  
BILATEC Gesellschaft zur Entwicklung  
biotechnologischer Systeme mbH, 07407  
Rudolstadt, DE

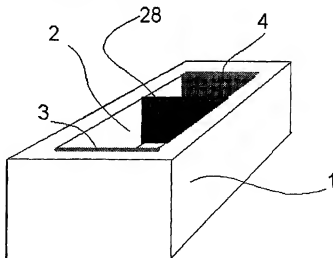
72 Erfinder:  
Bergmann, Clemens, Dr., 07745 Jena, DE; Kaplan,  
Thomas, Dr., 07407 Rudolstadt, DE; Bienhaus,  
Gerhard, Dr., 82407 Wielenbach, DE; Lange, Hans  
R., 68623 Lambertheim, DE

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

64 Vorrichtung und Verfahren zur Isolierung von elektrisch geladenen Molekülen

57 Vorliegende Anmeldung beschreibt eine nach oben offene Vorrichtung (Fig. 1a) zur Isolierung von geladenen Molekülen in einem Reaktionskanal mit Elektroden an den Enden und verschiedenen Zwischeneinbauten. Die Vorrichtung ist insbesondere für die Automatisierung in einem x,y,z-Roboter ausgelegt. Darüber hinaus werden Verfahren beschrieben, die während des elektrophoretischen Transfers weitere Prozessierung der Umgebung der Proben ermöglicht und z. B. für die Gewinnung von RNAfreier DNA oder DNAfreier RNA eingesetzt werden kann.



Gegenstand der vorliegenden Patentschrift sind Verfahren und Vorrichtung zur Isolierung von geladenen Molekülen mit einem breiten Anwendungsfeld zum Beispiel bei der Probenvorbereitung von Nukleinsäuren. Hierfür können spezielle elektrophoretische Prozesse wie zum Beispiel die Elektroelution zur Anwendung kommen wie sie beschrieben ist in WO 97/34908 und WO 98/58251. In diesem werden geladene Moleküle zunächst an einen Adsorber gebunden und dann in einem Elektroelutionsverfahren wieder freigesetzt, in ein Entnahmevolumentransferiert und dort auch konzentriert werden. Weitere Vorrichtungen zur Elektroelution sind beschrieben in US 5304449 sowie US 4608147. Beide Vorrichtungen sind jedoch nicht für Verfahren nach WO 97/34908 ausgelegt, sondern zeigen Vorrichtungen mit geschlossenen und verschraubten Kammerensystemen. Diese werden dann in einem Elektrophoresepuffertank entsprechend verankert, wobei das Kammerensystem hermetisch gegen den Elektrophoresepuffertank abgeriegelt ist: Vor allem auch im Hinblick auf eine Automatisierung in einem Pipettierroboter sind diese Vorrichtungen nicht geeignet.

Werden dagegen wie hier beschriebene Vorrichtungen eingesetzt, die nach oben geöffnet sind, können mit Hilfe einer Pipettiervorrichtung Nukleinsäuren bzw. Adsorber (z. B. in Partikelform), an die Nukleinsäuren gebunden sind, eingebracht werden. Solche Vorrichtungen sind generell für die Automatisierung mit der Verwendung von Pipettierrobotern (z. B. von der Firma TECAN, Rosys, Canberra Packard und Beckman) geeignet.

Bei der Entwicklung von solchen nach oben offenen Elektroelutionsdevices muß der Tatsache Rechnung getragen werden, daß, je nachdem wie die Gestaltung im Detail aussieht, mit einem elektroosmotischen Fluß (EOF) gerechnet werden muß. Einzelheiten dazu sind beschrieben in "Capillary Electrophoresis – Technology and Applications" (CEC-Guidebook Hewlett-Packard Publication Nr. 5968-3231B) Kapitel 2 und "Analysis of Nucleic Acids by Capillary Electrophoresis" (Chr. Heller (Ed.) ISBN 3-528-06871-X, 1997), Seite 24 ff. Dieser Fluß, ausgelöst z. B. durch Kapillardiffusionen in dem Elektroelutionsbereich, kann das Elektroelutionsverfahren erheblich beeinflussen, ja sogar unmöglich machen.

Die Vorrichtungen der vorliegenden Anmeldung berücksichtigen einerseits die Anforderungen an eine Automatisierung mit nach oben offenen Vorrichtungen und tragen andererseits den Anforderungen des elektroosmotischen Flusses Rechnung. Sie lassen sich überraschenderweise für Verfahren einsetzen, bei der Nukleinsäuren an Adsorber gebunden werden, die dann in eine Probeneintragskammer eingebracht und anschließend einer entsprechenden Elektroelution mit Probenaufkonzentration unterworfen werden.

Bei der Probenvorbereitung speziell von Nukleinsäuren aber auch von anderen geladenen Molekülen hat es sich gezeigt, daß es für eine möglichst einfache Handhabung – auch im Hinblick für eine Automatisierung – mit dem Transfer also der räumlichen Veränderung der geladenen Moleküle noch ein weiterer Prozessschritt verknüpft werden sollte. Dieser Prozessschritt kann eine Veränderung der geladenen Moleküle selbst oder aber die Veränderung des Umfeldes der geladenen Moleküle bewirken.

Ein solcher Prozessschritt verknüpft mit dem Transfer bei der Elektroelution ist bei dem gegebenen Stand der Technik nicht vorgesehen.

Eine der wichtigsten Anwendungen ist die Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischem Probenmaterial. Dazu ist zunächst eine Lyse des Probenmaterials notwendig um die Nukleinsäuren aus den biologischen Kompartimenten wie Zellkern, Mitochondrien, Virushüllen etc. freizusetzen. Für diese Lyse wiederum erwies sich der Einsatz von hohen Konzentrationen an Detergentien jeglicher Art als hilfreich. Für die hier relevanten elektrophoretischen Prozesse eignen sich insbesondere ionisch aufgebaute Detergentien, insbesondere wiederum solche, mit negativ geladenen Detergensmolekülen wie Natriumdodecylsulfat. Will man die freigesetzte Nukleinsäure der so lysierten Probe weiter verarbeiten z. B. in einer PCR nach US 4683195 oder einem Verdau mit Restriktionsenzyme, stören die hohen Detergenskonzentrationen und müssen entfernt werden. Diese Veränderung der Umgebung der geladenen Moleküle als neuer Prozessschritt läßt sich erfindungsgemäß zusammen mit dem Transferschritt in entsprechenden Vorrichtung und mit erfindungsgemäßen Verfahren durchführen. Eine weitere Anwendung gänzlich anderer Art leitet sich der molekularen Onkologie ab. Hier ist die Analyse von mRNA eines Onkogens z. B. ein wichtiger diagnostischer Parameter. Dabei ist es entscheidend, daß die mRNA von der analogen genomischen DNA isoliert und getrennt wird, da Reste der genomischen DNA die anschließende RT-PCR stört und ihre Aussagekraft verfälscht. Für die Gewinnung der mRNA in einem Probenvorbereitungsprozess gibt es derzeit zwei Standardverfahren: a) die Hybridisierung der mRNA mit einem festphasengebundenen oligo(dT), der an die von Natur aus vorhandenen oligo(A)-Sequenz der mRNA bindet und anschließende Freisetzung nach Waschen, sowie Verfahren, die durch selektive Fällung die mRNA isoliert. Beide Verfahren haben Nachteile, so läßt sich zu a) feststellen, daß die mRNA dazu neigt zu zerbrechen und man mit diesem Verfahren nur Teile der mRNA erfaßt, was für eine quantitative Analyse nicht geeignet ist. Die Verfahren nach b) sind von der Handhabung aufwendig und lassen sich schwer automatisieren, da Zentrifugationsschritte notwendig sind.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß durch Verknüpfung von Transfer und einem weiteren Prozessschritt, nämlich des enzymatischen DNA-Verdaus in diesem Falle, die Isolierung der mRNA ohne DNA-Verunreinigungen möglich ist.

Gegenstand der vorliegenden Anmeldungen sind daher auch Verfahren und Vorrichtungen zum Zwecke der Isolierung von geladenen Molekülen, die mit dem elektrophoretischen Transfer eine weitere Prozessierung verknüpfen, wobei sich diese Prozessierung auf die Umgebung der geladenen Moleküle oder aber auf die Moleküle selbst beziehen kann.

Fig. 1a zeigt schematisch die perspektivische Ansicht einer erfinderschen Vorrichtung. Es handelt sich dabei um einen Grundkörper (1), in den ein Reaktionskanal (2) eingearbeitet wurde. Der Reaktionskanal (2) zeichnet sich dadurch aus, daß er oben offen ist, einen entsprechenden Boden sowie Seitenwände enthält, so daß der Innenraum mit Elektrolösung gefüllt werden kann. Der Reaktionskanal (2) ist in einer rechteckigen oder zylindrischen Form ausgeführt, bei der die kurzen Seiten jeweils mit Elektroden (3, 4) an den äußeren Enden versehen werden. Zwischen diesen Elektroden (3, 4) erstreckt sich der Reaktionskanal (2), der erfindungsgemäß mit mindestens einem Zwischeneinbauelement (28) versehen werden kann, so daß mindestens zwei Flüssigkeitskammern (z. B. 10, 7 in Fig. 2a) erzeugt werden können. Der Kanal (2) hat typischerweise ein Volumen von 0,01–5 ml, bevorzugt jedoch 0,2–2 ml. Der Grundkörper (1) besteht aus elektrisch

nicht leitendem Material, in der Regel aus Kunststoffen wie Polyacetal, Polycarbonat, Polyamid, Polystyrol, Polyethylen, Polypropylen, Polyacrylaten, Polyvinylchlorid oder ähnlichem und kann aus Halbzeug oder im Spritzguß- oder Blasenziehverfahren hergestellt werden. Im Einzelfall können auch glasfaserverstärkte Kunststoffe oder Kunststoffe mit anderen Zuschlagstoffen Verwendung finden.

Fig. 1b zeigt eine erfindersiche Variante der oben geschilderten Grundform des Kanals (2). Hier ist er in der Mitte eingeschnürt. Überraschenderweise wurde gefunden, daß mit dieser Formgebung eine besonders effiziente Aufkonzentration von geladenen Molekülen erreicht werden kann. Diese Form trägt folgenden Phänomenen Rechnung, die überraschenderweise bei der Elektroelution auftreten: a) Durch die elektrolytische Zersetzung an den Elektroden verändert sich der pH-Wert. Die Kammern um die Elektroden müssen deshalb ein, ausreichendes Volumen aufweisen, um ausreichend Pufferkapazität zur Verfügung zu stellen. b) Um eine ausreichende Aufkonzentration zu erreichen ist es jedoch erforderlich, ein möglichst kleines Probenentnahmenvolumen zu erhalten. Beides kann durch die Einschnürung (32) entsprechend erreicht werden, wenn sich der Probenentnahmeraum (7) an der Einschnürung (32) befindet. Die in Fig. 1b gezeigte Ausführung ist bevorzugt als Spritzgußteil zum einmaligen Gebrauch bestimmt, und weist Schlitze (12) im Grundkörper (1) für die Zwischeneinbauten, wie zum Beispiel die semipermeable Membran (14), auf, die im folgenden näher beschrieben sind: Erfindungsgemäß können auch mehrere Vorrichtungen in einem Verbund vorliegen, so zum Beispiel in Streifenform oder als Platten, wobei das 96-Mikrotitrationsplattenformat, wie beschrieben in US 4 154 795 eine bevorzugte Lösung ist.

Fig. 1h zeigt eine solche Ausführung mit Mikrotitrationsplattenstreifen (19) 4 8 Kanäle (2) und einem passenden Mikrotitrationsplattenrahmen (18). In einer miniaturisierten Version können auch Formate mit 384 und 1536 Kanälen zum Einsatz kommen.

Der Kanal (2) kann auch aus verschiedenen Einzelelementen Fig. 1c-g zusammengesetzt und z. B. mit einer Spannvorrichtung (23) in Fig. 1g zusammengehalten werden. Diese erfindersiche Ausführung besteht aus einzelnen Grundelementen (Fig. 1c-1f), die mittels Dichtelemente (25) an Paßflächen (20) aneinandergerichtet und dann mit einer oder mehreren Spannvorrichtungen (23) zusammen gepreßt werden: Die Grundelemente sind in der Regel nach oben offen und U-förmig, können im Einzelfall jedoch auch nach oben geschlossen sein.

Fig. 1c zeigt den nach unten geschlossenen Grundkörper (1) mit einer entsprechenden Aussparung (2), die darin den Reaktionskanal (2) bilden, wenn mehrere Grundelemente verbunden mit Dichtelementen (25) an der entsprechende Paßfläche (20) mittels Spannvorrichtung (23) zusammengepreßt werden.

Fig. 1d zeigt eine Ausführung eines Zwischeneinbaus (28) für den Reaktionskanal (2). Sie besteht aus einem Rahmen (29) mit einem rechteckigen oder runden Fenster, in das Materialien für die Zwischeneinbauten (28) eingebracht werden können. In einer bevorzugten Ausführung ist dieses Element in einem schichtweisen Aufbau gefertigt, mit Laminierfolien (29) außen und den entsprechenden Zwischeneinbaumaterialien (28) in der Mitte. Das Element wird dann mit Hilfe eines Laminiergerätes verschweißt und weist dadurch eine glatte Paßfläche (20) und somit auch eine gute Dichtigkeit auf.

Fig. 1e stellt eine entsprechende Dichtelement (25) dar mit den beidseitigen Paßflächen (20). Dieses Dichtungselement ist erfindungsgemäß aus Silikon oder aus Teflon, je nach Einsatz der Reaktanten.

Fig. 1f stellt eine Ausführung für Elektroden dar, die als Plattenelektrode oder aber in schichtweisem Aufbau wie Fig. 1d aufgebaut ist. Dabei ist eine elektrische Zuleitung (30) für die im Fenster befindlichen Elektroden (3, 4) vorgesehen.

Fig. 1g zeigt in der Aufsicht ein aus Grundelementen zusammengesetzten Reaktionskanal mit verschiedenen Zwischeneinbauten. Es erwies sich als vorteilhaft die Grundelemente in einer Aufnahme (26) einzubringen, an der eine entsprechende Spannvorrichtung (23) angebracht ist.

Anstelle der Aufnahme (26) mit Spannvorrichtung (23) können auch erfindersiche Elemente wie Fig. 1i und 1j zum Einsatz gelangen, die über einen entsprechenden Klemmkonus (9) mit oder ohne Rastnasen (16) zusammengesteckt werden können und auch ohne Spannvorrichtung (23) flüssigkeitsdicht zusammenhalten. In Fig. 1i ist das Grundelement zur Begrenzung des Kanals dargestellt, der in diesem Falle durch Zusammenstecken mit dem Grundelement zur Verlängerung aus Fig. 1j in beliebiger Länge erzeugt werden kann. Auf der entgegengesetzten Seite erfolgt dann eine Begrenzung mit einem identischen Grundelement wie Fig. 1i. Dieses hat entweder wie in Fig. 1i dargestellte entsprechende Schlitze zur Aufnahme von Elektroden (3). Erfindungsgemäß haben sich jedoch zwei davon abweichende Varianten als vorteilhaft erwiesen: Bei Variante A wird dabei in einem Zweikomponentenspritzgußprozeß eine Elektrode aus leitfähigem Kunststoff beim Produktionsprozeß direkt eingespritzt. Überraschenderweise läßt sich in Variante B auch das gesamte Grundelement aus leitfähigem Kunststoff herstellen. Dies stellt eine besonders kostengünstige Variante dar. Als Blendzuschlagstoffe für Polypropylen haben sich als besonders vorteilhaft dafür Materialien mit Widerständen kleiner 1000 Ohm wie zum Beispiel Cabelec 3827 und Pre-Elec 1362 erwiesen. Das Verlängerungselement nach Fig. 1j muß entsprechend aus nichtleitendem Kunststoffen, bevorzugt Polypropylen hergestellt werden.

In Fig. 1j ist eine weitere erfindersiche Variante dargestellt, da hier eine Öffnung (31) einen Zugang zum Reaktionskanal (2) ermöglicht. Diese Öffnung (31) kann auch zum Absaugen von Lösungen, z. B. bei Waschvorgängen, benutzt werden.

Mehrere solcher Reaktionskanäle können über integrierte Verbindungselemente (21) wie zuvor geschildert zu einem Verbund, bevorzugt im das 96-Mikrotitrationsplattenformat zusammengesteckt werden. Eine Integration in einen entsprechenden Rahmen ist ebenfalls einfach zu erreichen.

Der Reaktionskanal kann auch eine Verzweigung beinhalten.

Im Folgenden werden die verschiedensten Zwischeneinbauten (28) im Kanal (2) näher beschrieben werden, die verschiedenen Funktionen erfüllen, wobei ein Zwischeneinbau (28), den Reaktionskanal (2) in einen Probenentnahmeraum (10) und in einen Probenentnahmeraum (7) teilt, wie in Fig. 2 dargestellt (Fig. 2a: Aufsicht, Fig. 2b: Schnittdarstellung).

In einer erfindungsgemäßen Vorrichtung muß ein Zwischeneinbau (28) folgende Kriterien erfüllen, um, z. B. für eine Elektroelution, geeignet zu sein. Der Zwischeneinbau muß

- a) eine elektrische Leitfähigkeit vermitteln,

- b) eine Durchlässigkeit für geladenen Moleküle ermöglichen,
- c) eine Flüssigkeitssperre darstellen; sodaß die beiden Räume (10, 7) keinerlei Flüssigkeitsaustausch besitzen, wenn keine Spannung an den Elektroden anliegt,
- d) gegebenenfalls Partikel zurückzuhalten und
- e) ggf. einen elektroosmotischen Fluß zur Aufkonzentrierung erzeugen.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß eine erfindersiche Vorrichtung wie Fig. 3 z. B. diese Kriterien erfüllt. Dabei ist eine semipermeable Membran (14) in der Nähe der Anode (4) angebracht, so daß ein Anodenraum (8) zwischen der Membran (14) und der Anode (4) entsteht. Darüberhinaus ist ein weiteres Element, nämlich ein Gewebe (5) zwischen der semipermeablen Membran (14) und der Kathode (3) eingebracht. Hierbei handelt es sich bevorzugt um ein Präzisions-Sieb Gewebe mit einer definierten Maschenweite und mit einer definierten offenen Siebfäche, wie beschrieben in "Synthetische Monofilament Präzisions-Sieb Gewebe" (Firmenbrochure Fa. Sefar, Rüslikon, Schweiz). Bei diesem Gewebe (5) kann es sich um Nylon- und/oder Polyester Gewebe handeln. Diese Gewebe (5) können auch entsprechend kalandriert oder ähnlich behandelt sein. Die Erfüllung der zuvor geschilderten Anforderungen wurde bei solchen Geweben nur in einem bestimmten Bereich für die Maschenweite und für die offene Siebfäche festgestellt. Die Maschenweite beträgt dabei 0,1–500 µm, bevorzugt jedoch 0,5–10 µm, die offene Siebfäche 0,2%–40%, bevorzugt jedoch 0,5–2%. Die Art des Materials spielt dabei ebenfalls eine große Rolle. Wie Beispiel 1 (S. 10) zeigt wird an dem Gewebe (5) ein elektroosmotischer Fluß erzeugt, der das Volumen des Probenentnahmerums (7) verringert. Es können bei diesem Gewebe (5) auch andere Arten von Geweben, wie z. B. Wolle, Baumwolle zum Einsatz gelangen. Ein solches Gewebe (5) läßt sich in einem Zwischeneinbau (28) in einer Vorrichtung nach Fig. 3 zur Durchführung einer Elektroelution dahingehend verwenden, daß in den Probenentnahmeraum, der dem Kathodenraum (6) entspricht, z. B. Partikel eingebracht werden, die als Adsorber mit elektrisch geladenen Molekülen, insbesondere Nukleinsäuren, beladen sind (Fig. 9c und Beispiel 4, S. 11 ff). Nach Befüllung des Probenentnahmerums (7) sowie des Anodenraums (8) mit einer entsprechenden Elektrolytflüssigkeit läßt sich dann durch Anlegen einer Spannung zwischen den Elektroden (3, 4) eine Trennung der geladenen Moleküle von dem Adsorber erreichen. Das Gewebe (5) behindert dabei die elektrische Leitfähigkeit nicht und läßt geladene Moleküle, insbesondere Nukleinsäuren, passieren. Außerdem erfüllt es die Aufgabe, die Partikel im Probenentnahmeraum (10) zurückzuhalten, so daß aus dem Probenentnahmeraum (7) eine entsprechend klare Nukleinsäurelösung entnommen werden kann. Darüber hinaus wird durch das Gewebe gewährleistet, daß bei der Entnahme der Nukleinsäure mit einer Pipette nur im begrenzten Umfang Elektrolytlösung aus der Probenentnahmerkammer (10) hier identisch (6) nachfließt und die isolierte Nukleinsäure verunreinigt. Weiterhin hat die Ausführung nach Fig. 3 eine semipermeable Membran (14), die geladenen Moleküle ab einem gewissen Molekulargewicht daran hindert in den Anodenraum (8) zu wandern. Dieser Zwischeneinbau hat also eine Schutzfunktion und verhindert das Vordringen der geladenen Moleküle in den Anodenraum und eine oxidative Zerstörung dieser an der Elektrodenoberfläche.

Überraschenderweise wurde festgestellt, daß in Folge des zuvor erwähnten elektroosmotischen Flusses das Puffervolumen in der Probenentnahmerkammer (7) bei richtiger Auswahl der Gewebe (5) reduziert wird und auf diese Art und Weise eine Aufkonzentration der geladenen Moleküle stattfindet. Dies ist vor allem bei der Nukleinsäureanalytik ein entscheidender Vorteil. Bei der Anwendung einer Vorrichtung nach Fig. 3 mit Partikeln, die in den Kathodenraum (6), der dem Probenentnahmeraum (10) entspricht, eingebracht werden, ist ein weiterer erfindersicherer Vorteil, daß die Partikel bei geeignetem Gewebe im Probenentnahmeraum (10) identisch (6) zurückgehalten werden, so daß aus dem Probenentnahmeraum (7) eine entsprechend klare Nukleinsäurelösung entnommen werden kann. Es muß dabei Sorge getragen werden, daß die Ausschlußgröße der Gewebemaschenweite dem der verwendeten Partikel entsprechend angepaßt werden muß.

Es kann in einer weiteren Variante auch eine Flüssigkeitssperre (13) eingesetzt werden, die durch entsprechende Führungen (12) in den Grundkörper (1) flüssigkeitsdicht und beweglich eingebracht werden kann, wie Fig. 4 bzw. 5a und 5b zeigen. Fig. 5a zeigt die Flüssigkeitssperre (13) in offenen Zustand, während Fig. 5b den geschlossenen Zustand zeigt, bei dem durch Eindrücken der Flüssigkeitssperre (13) in den Grundkörper (1) der Reaktionskanal (2) geschlossen wird.

Fig. 6 verdeutlicht nun den Anwendungsbereich einer solchen Flüssigkeitssperre (13). Die entsprechende Vorrichtung sieht neben den Elektroden (3, 4) und der semipermeablen Membran (14) ein entsprechendes Gewebe (5) und/oder eine Fritte (27) vor. Letztere bilden in Richtung der Kathode (3) einen Probenentnahmeraum (10), in den Partikel nach Beispiel 4 eingebracht werden können. Nach erfolgter Elektroelution sammeln sich die geladene Moleküle im Probenentnahmeraum (7) an, da die Flüssigkeitssperre (13) zunächst geöffnet ist. Durch Eindrücken der Flüssigkeitssperre (13) entsteht nun ein gegen den Raum (6) flüssigkeitsdicht geschlossener Probenentnahmeraum (7), aus dem mit Hilfe von Pipetten z. B. die geladenen Moleküle in der Regel Nukleinsäure entnommen werden können. Scheiben oder Blöcke aus herkömmlichen Agarose- oder Polyacrylamidgelen stellen besonders geeignete Zwischeneinbauten dar, wobei für Vorrichtungen zur Nukleinsäureisolierung z. B. gefunden wurden, daß besonders Gele mit niedrigem Vernetzungsgrad, also kleinen Anteilen an Gelfüllstoff von besonderem Vorteil sind. Wiederum zeigte sich, daß die Dicke der Zwischeneinbauten entsprechend dünn sein sollten. Sie betragen 0,1–20 mm, bevorzugt jedoch 0,5–5 mm. Die Anteile an Gelfüllstoff in erfindungsgemäßen formstabilisierten Gelen wie z. B. Agarose beträgt 0,1–10%, bevorzugt jedoch 0,12–4%. Versuche auf herkömmliche Weise, solche dünnen Gelscheiben herzustellen scheitern wegen der mangelnden Formstabilität. Überraschenderweise wurde festgestellt, daß diese Gele auf verschiedensten Arten formstabilisiert werden können, so daß sie danach in einer erfindersichen Vorrichtung eingebracht werden können. Die Formstabilisierung erfolgt durch Einbringen von Stützelementen, wobei es zwei erfindersiche Varianten gibt. Bei Variante A wird der Zwischenraum zwischen zwei Geweben (5) mit der warmen, flüssigen Gelmasse ausgegossen. Nach Erkalten wird die Gelmasse fest und ist durch die Gewebe entsprechend formstabilisiert, so daß auch Gelschichten mit niedrigen Agarosekonzentrationen eingesetzt werden können. Beispiele 5 und 7 schildern die Herstellung im Einzelnen. Fig. 7b zeigt diesen schichtartigen Stabilisierungsaufbau mit den zwei Geweben (5) und der dazwischengeschalteten Gelschicht (34). Dieser Gesamtaufbau wird im Folgenden als formstabilisiertes Gel (33) bezeichnet. Eine weitere erfindersiche Variante B (Beispiel 7) ist der Einsatz eines gesinterten Kunststoffis als Stützelement, das mit zunächst noch flüssigen Gel so getränkt ist, daß nach Festwerden des Gels seine Poren mit Gel, ausgefüllt sind. Solche gesinterten Kunststoffe sind aus Polyethylen, Polypropylen oder ähnlichem

Material und werden durch einen Sinterprozeß aufgeschäumt, so daß verschiedenste Kapillarstrukturen entstehen. Die Kapillaren sind von ihren Abmaßen 1–200 µm, bevorzugt jedoch 20–120 µm. Solche formstabilisierten Gele erfüllen zum einen den Zweck, daß sie für geladene Biomoleküle in gewissen Molekulargewichtsbereichen durchlässig sind, daß sie zum anderen Flüssigkeitssperren darstellen. Beispiel 7 schildert weitere Details der Herstellung dieser Variante B. Eine breite Anwendung solcher formstabilisierten Gelen ist bei verschiedensten Blotting-Techniken gegeben. Hier kann es bei Verwendung von Gelen nach dem Stand der Technik ohne Formstabilisierung zu einem Zerreißen infolge unsachgemäßer Handhabung kommen, da gerade für diese Techniken Gele manuell mehrmals transferiert werden müssen. Durch Anwendung der erfindungsgemäße Formstabilisierung ergibt sich hier ein großer Vorteil hinsichtlich einfacher und sicherer Handhabung beim Umbettender Gele, da ein Schutz hinsichtlich Zerstörung des Gellkörpers gegeben ist. Bei der Verwendung von hier geschilderten nach oben offenen Vorrichtungen muß der Tatsache Rechnung getragen werden, daß je nach dem wie die Gestaltung im Detail aussieht, mit einem elektroosmotischen Fluß (EOF) gerechnet werden muß.

Dieser Fluß, ausgelöst z. B. durch Kapillaröffnungen in dem Elektroelutionsbereich, können das Elektroelutionsverhalten erheblich beeinflussen, ja sogar unmöglich machen. Wird der EOF so eingesetzt, daß er einerseits zu einer moderaten Reduktion des Volumens des Probenentnahmeraumes führt, andererseits aber die Wanderung der geladenen Moleküle nicht zu stark behindert, kann eine Aufkonzentration dieser erreicht werden, was für den gesamten Prozeß von Vorteil ist. Überraschenderweise wurde gefunden, daß dies mit formstabilisierten Gelen erreicht werden kann, wozu weitere Details in den Beispielen beschrieben sind. Eine weitere Problematik ist die Anwendung einer geeigneten Stromspannung für die erfindenden Transferprozesse. Hier ist es aus sicherheitstechnischen Erwägungen sinnvoll, im sogenannten Niederspannungsbereich unter 42 V Gleichspannung zu bleiben, da dann keine Abdeckungen des strömeführenden Reagenzkanals notwendig ist. Die erleichtert vor allem eine Automatisierung. Überraschenderweise wurde gefunden, daß dies durch Einsatz eines Puffers mit höherer Ionenleitfähigkeit im Anoden- und Kathodenraum erzielt werden kann. Der Puffer kann dabei 2–30fach, bevorzugt jedoch 5–15fach konzentrierter sein als in den innenliegenden Kammern. Ein formstabilisiertes Gel zwischen Probenentnahmeraum (10) und einer benachbarten Anodenkammer (8), die mit einer wie zuvor geschildert höheren Pufferkonzentration befüllt wird, wirkt erfindungsgemäß wie eine semipermeable Membran und schützt die geladenen Moleküle davor, an die Anode (4) zu gelangen und ggf. zersetzt zu werden. Als erfinderscher Vorteil ist das formstabilisierte Gel besser durchlässig für Detergentien.

Zur Lösung spezieller Aufkonzentration- und Fokussierungsfragestellungen können auch erfindungsgemäß Puffergradienten zwischen den Elektrodenkammern zu den Kammern im Innenraum zum Einsatz gelangen, wobei die stärker konzentrierten Puffer jeweils an den Elektroden eingesetzt werden. Auch haben sich Mehrpuffersysteme, als erfinderscher erwiesen, bei denen benachbarte Kammern mit unterschiedlichen Puffersubstanzen und unterschiedlichen pH-Werten zum Einsatz gelangen. Dieser Vorteil kann auch durch Mischung von unterschiedlichen Puffern beim Probeneintrag genutzt werden.

Die Verwendung von formstabilisierten Gelschichten in einem erfindungsgemäßen Reaktionskanal unter Berücksichtigung der zuvor geschilderten Randbedingungen ermöglichen eine Vielfalt von Anwendungen, bei denen geladene Moleküle transferiert und gleichzeitig die Umgebung prozessiert werden kann, wie im Folgenden näher beschrieben wird.

Eine Vorrichtung nach Fig. 7a mit einem Gewebe (5), einer formstabilisierten Gelschicht (33) und einer semipermeablen Membran (14) als Flüssigkeitssperren kann wie folgt zur Isolierung von Nukleinsäuren benutzt werden. In den Probeneintragsraum (10) wird Nukleinsäure eingebracht, die Vorrichtung wird mit Elektrolyt oder Elektrophoresepuffer so weit befüllt, daß die Zwischeneinbauten noch herausragen und an die Elektroden wird eine Gleichspannung angelegt. Die Nukleinsäure wandert durch das formstabilisierte Gel (33) und reichert sich vor der semipermeablen Membran (14) im Probenentnahmeraum (7) an. Durch den elektroosmotischen Fluß vermindert sich der Flüssigkeitspegel in Kammer (7) und die Nukleinsäure wird in konzentrierter Form entnommen. Je nach Anteile an Gellöffstoff im formstabilisierten Gel kann auch eine Selektionierung der Nukleinsäuren nach Molekulargewicht vorgenommen werden.

Zur Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen Proben eignet sich u. a. Fig. 7f. Hier schließt eine semipermeable Membran (14) den Kathodenraum (6) ab und stellt die Verbindung zum Probeneintragsraum (10) dar. Zur Anode befinden sich zwei formstabilisierte Gele (33) und (33a), die den Probenentnahmeraum (7) und den Anodenraum (8) begrenzen. Eine aus einer biologischen Probe gewonnenen Lysemischung mit freigesetzten Nukleinsäuren wird in die Probeneintragskammer (10) eingebracht. Die Lysemischung enthält zur Freisetzung der Nukleinsäuren und Zerstörung der biologischen Strukturen Detergentien wie Lithium-, Natriumdodecylsulfat, Cetylammmoniumbromid, ionische Tenside oder ionische Glykoside o. ä. Diese werden in Konzentrationen von 0,1–10%, bevorzugt jedoch 0,1–2% eingesetzt. Es können aber auch chaotrope Salze wie Guanidiniumthiocyanat, Guanidiniumhydrochlorid, Jodsalze, Perchlorate o. ä. zum Einsatz gelangen. Die Vorrichtung wird mit Elektrolytlösung befüllt und eine Spannung wird angelegt. Das formstabilisierte Gel (33) hat einen geringen Anteil an Gellöffstoff, der 0,12%–0,2% beträgt und hält nicht nur größere Zelltrümmer sondern auch größere Proteinaggregate zurück. Die freigesetzten Nukleinsäuren und das Detergens, z. B. Natriumdodecylsulfat passiert diesen Zwischeneinbau; wobei das Detergens infolge seines kleineren Molekulargewichtes über die Kammer (7) schneller in die Anodenkammer (8) durchfließt, als die Nukleinsäure. Das formstabilisierte Gel (33a) trennt somit die Nukleinsäuren vom Detergens. Die Nukleinsäuren werden von diesem formstabilisierten Gel (33a) zurückgehalten und aus der Kammer. (7) entnommen. Eine semipermeable Membran muß in diesem Falle entfallen: einerseits reicht der Schutz durch das formstabilisierte Gel (33a) aus, andererseits wurde überraschenderweise wurde festgestellt, daß Detergentien wie SDS formstabilisierte Gele generell leicht passieren, während in Folge von Mycelbildung vermutlich semipermeable Membrane als Zwischeneinbauten das Detergens zurückhalten. Der elektrophoretische Prozeß dauert 1–30 min. bevorzugt jedoch 2–12 min. und läßt sich dadurch sehr einfach automatisieren, daß die erfindungsgemäße Vorrichtung zusammen mit einer geeigneten Stromversorgungseinheit auf einen Pipettierroboter gestellt wird. Die Flüssigkeiten können dann automatisch pipettiert werden und für den Isolierungsprozeß ist ein elektrisches Signal vom Pipettierroboter notwendig, das die Stromversorgungseinheit ein- und ausschaltet. Anschließend kann die isolierte Nukleinsäure mit dem Roboter entnommen und für die weitere Verarbeitung verwendet werden. Reicht die direkte Abreicherung des Detergens aus der Lysemischung nicht aus, so kann in einer Vorrichtung nach Fig.

7d mit zwei formstabilisierten Gelschichten (33) und (33a) als Flüssigkeitssperren ein abgewandelter Prozeß zur Isolierung von Nukleinsäuren wie folgt benutzt werden. In diesem Falle werden in den Kathodenraum (6) Partikel, bevorzugt solche, die magnetische Eigenschaften besitzen, eingebracht, die mit Nukleinsäure zuvor beladen und ggf. auch mit Waschlösungen behandelt wurden. Das erste Gewebe (5) ist so ausgelegt, daß es die Partikel zurückhält. Nach Befüllung mit Elektrolyt und Anlegen einer Spannung an die Elektroden (3, 4) wandern geladene Biomoleküle durch das Gewebe in die Kammer (35) und durch das formstabilisierte Gel (33) wie zuvor, werden dann aber durch das formstabilisierte Gel (33a) zurückgehalten, während Detergensreste die z. B. an den Partikel adsorbiert sind diese passieren. Die detergensfreie Nukleinsäure wird aus dem Probenentnahmeraum (7) entnommen. Zur Entfernung größerer Detergensmengen, bei Natriumdodecylsulfat z. B. größer als 2% können erfindungsgemäß auch spezielle Kammern eingesetzt werden, die detergensbindende Mittel beinhalten oder Mittel, die Detergens ausfüllen. Auch ist es möglich detergensbindende Mittel nach der Lyse zuzugeben und durch die Elektroelution dann abzutrennen. Als detergensbindende Mittel können bevorzugt hydrophobe makroporöse Partikel mit großer innerer Oberfläche wie z. B. Detergenz Adsorber-Gel [Fa. Roche Diagnostics, Mannheim Kat. Nr.: 1 500 678]. Außerdem können zuvor genannte Materialien auch in gesinterter Form als Zwischeneinbau (28) zum Einsatz kommen, um Detergentien zu binden.

Je nach Konzentration der Agarose in Agarosegelen bzw. des Polyacrylamids in Polyacrylamidgelen können die Kappillarstrukturen der Gele verändert werden und diese Materialien werden im Elektrophoreseprozeß als Molekularsiebe eingesetzt ("Electrophoresis Theorie, Technics and Biochemical and Chlnical Applications" A. T. Andrews (Ed.) ISBN 0-19-854633-5, Clarendon Press; Oxford 1988). Dazu werden jedoch entsprechend große Wanderungstrecken (2-80 cm) benötigt. Überraschenderweise wurde jedoch gefunden, daß mit der Vorrichtung gemäß Fig. 7 auch in dünnen formstabilisierten Gelschichten von 0,1-20 mm, bevorzugt jedoch 0,5-5 mm Trennung von geladenen Molekülen stattfinden kann, so daß neben der oben geschilderten Flüssigkeitssperre auch die Funktion als Molekularsiebe für die Isolierung von geladenen Molekülen eingesetzt werden kann.

Darüber hinaus kann die formstabilisierte Gelschicht auch als Schutz der Anode eingesetzt werden und die semipermeable Membran (14) ersetzen. Im Falle des Einsatzes von Agarose muß die Agarose-Konzentration dafür 2-5%, bevorzugt 2,5-3,5% sein.

Eine weitere Anwendung ist die Isolierung von Ribonukleinsäure (RNA), bevorzugt messenger RNA (mRNA) aus biologischen Proben, also in Gegenwart genomischer homologer DNA. Die Prozessierung der Lysemischung besteht in diesem Falle erfindungsgemäß in einem DNase-Verdau während des Nukleinsäuretransferschrittes. Da die Elektrolytösung im allgemeinen einen pH-Wert von 7,25  $\pm$  0,5 aufweist, kann bei Verwendung einer DNase mit einem  $pI > 7$ , bevorzugt  $pI \approx 9$ , dieser Prozeß in einer Vorrichtung nach Fig. 7d durchgeführt werden. Die aus der biologischen Probe hervorgehende detergentshaltige Lysemischung wird in Kathodenkammer (6) eingefüllt, der Reaktionskanal mit Elektrolyt befüllt und der Transfer durch Anlegen einer Spannung an die Elektroden gesteuert. Zellreste und grobe Verunreinigungen bleiben an dem Gewebe (5) hängen. Statt dem Gewebe kann auch ein drittes formstabilisiertes Agarosegel zum Einsatz gelangen. Nukleinsäuren, in diesem Falle DNA und RNA passieren diesen Zwischeneinbau zusammen mit dem Detergens, wenn es ebenfalls negativ geladenen ist. Das Detergens wandert jedoch schneller und passiert teilweise auch das anschließend formstabilisierte Gel (33). Auf diese Weise wird die Kammer (35) detergentsfrei und eine DNA-Abbau kann mittels DNase, die durch Detergentien inhibiert wird, durchgeführt werden. Dazu wird die Spannung unterbrochen und eine DNase-Lösung wird in die Reaktionskammer (35) zugegeben ggf. kurz inkubiert und anschließend der Transferprozeß fortgesetzt. Nach dem Abbau der DNA kann durch die geeignete erfinderische Wahl des pH-Wertes der DNase, erreicht werden, daß diese von der zurückbleibende RNA separiert wird und eine RNA-Preparation DNase-frei aus der Kammer (7) entnommen werden kann. Das entsprechende Detergens ist derweil durch das formstabilisierte Gel (33a) bis in Anodenkammer (8) vorgeordnet: Die DNase ist auf Grund ihres  $pI$ -Wertes z. B. positiv geladen und wandert in entgegengesetzte Richtung zur RNA. Bei einer etwas abgewandelten Anwendung erfolgt der DNA-Verdau mittels festphasengebundener DNase, die in Kammer (35) zu pipettiert wird. Diese Variante hat den Vorteil, daß sie unabhängig vom  $pI$  der eingesetzten DNase ist. Dies gilt auch bei Verwendung von thermolabilen DNasen, die bei der anschließenden RT-PCR z. B. in einem ersten Heizschritt zerstört werden kann.

Eine weitere Anwendung, die die bisher notwendige Unterbrechung der Stromzufuhr für einen Pipettenschritt umgeht, was wiederum für eine schnelle automatische Abarbeitung hinderlich ist, nutzt eine DNase mit einem  $pI$  kleiner als der  $pI$ -Wert des Elektrolyten. In diesem Falle wandert die Nuklease zusammen mit der Nukleinsäure. Durch Verwendung einer Vorrichtung nach Fig. 7e mit einem gegenüber Fig. 7d zusätzlichen formstabilisierten Gel (33b) bei der Kathode (3), bei der die Nuklease mit dem Elektrolyten in die Reaktionskammer (35b) eingefüllt und die lyisierte Probe in Probeneintragskammer (10) wird, wandert die Nuklease langsamer als das Detergens jedoch schneller als die DNA aus der Probe und zerstört diese.

Neben den oben erwähnten Möglichkeiten der Deaktivierung der Nuklease, besteht die erfinderische Möglichkeit, solidphasengebundene Antikörper gegen die Nuklease oder solidphasengebundene Proteinase K in das formstabilisierte Gel (33) einzubringen, die das Enzym binden bzw. abbauen und somit deaktivieren. Solche Prozesse würden dann wie folgt in Vorrichtungen nach Fig. 7d ablaufen: Die Kammer (6) wird mit der lyisierten Probe und die übrigen Kammern mit Elektrolyt befüllt. Die Elektroelution wird gestartet und nach 1-5 min, bevorzugt jedoch 1-2 min unterbrochen. Anschließend wird solidphasengebundene DNase in die Reaktionskammer (35) eingefüllt und inkubiert. Anschließend wird die Elektroelution fortgesetzt und die DNA-freie Probe aus der Probenentnahmekammer (7) entnommen. Es hat sich gezeigt, daß in der Praxis ein geringer Anteil an DNase sich bei diesem Prozeß ablösen kann und je nach  $pI$ -Wert mit der Probe in die Probenentnahmekammer (10) wandert, was für die weitere Verarbeitung ungünstig ist. In diesem Falle kann erfindungsgemäß solidphasengebundene Proteinase K oder aber Antikörper gegen die DNase in löslicher oder solidphasengebundener Form in die Reaktionskammer (35) vor dem erneuten Start der Elektroelution gegeben werden; so daß die DNase deaktiviert wird. Dabei muß Sorge getragen werden, daß vor allem Proteinase K nicht in die Probenentnahmekammer (10) gelangt, da diese z. B. die anschließende PCR dahingehend stören kann, daß die dort verwendete Taq-Polymerase deaktiviert wird. Der  $pI$  der vollständigen Proteinase K liegt bei  $pI$  6,60 wegen der  $pI$  eines besonders aktiven Teiltrags (Aminosäuren 106-384) bei 8,25. Besonders dieses Fragment eignet sich für die erfinderische Anwen-

ung, da es bei neutralem pH positiv geladen ist und zur Kathode wandert und nicht in den Probenentnahmeraum wandert.

Eine weitere Möglichkeit besteht auch, daß solidphasegebundene Proteinase K oder aber solidphasegebundene Antikörper gegen die DNase in das noch flüssige Gel gegeben und dadurch in einer formstabilisierten Gelschicht vorgehalten wird, was wiederum einen Pipettierschritt einsparen würde. Eine vergleichbare Anwendung ist die Entfernung von RNA aus einem DNA/RNA-Gemisch durch Behandlung mit RNase oder die Isolierung von Proteingemischen mit analogen Methodiken.

Eine weitere erfinderische Lösung ist die Anwendung von Puffern mit unterschiedlichem pH-Werten in den verschiedenen Kammern der hier beschriebenen Vorrichtungen. Je nach pI-Werten der zugesetzten Proteine oder Enzyme kann eine benachbarte Kammer mit einem pH-Wert dergestalt befüllt werden, daß die gewünschten geladenen Moleküle wie z. B. Nukleinsäuren diese Kammer passieren, die Zuschlagstoffe jedoch nicht.

Eine denkbare Anwendung ist in Fig. 7g in der Perspektive und in Fig. 7h im Schnitt dargestellt. Es handelt sich um ein Agaroseflächbettgel (36) mit drei eingearbeiteten Aufnahmetaschen, die als Probenentragskammer (10), Reaktionskammer (35) und Probenentnahmekammer (7) genutzt werden. Es ist dabei Sorge zu tragen, daß der Elektrolyt nicht über den oberen Rand des Flächbettgels steigt, um eine Vermischung der diversen Reaktanten vor allem in Kammer (35) zu vermeiden. In solchen Vorrichtungen sind die hier beschriebenen Prozesse nicht durchführbar, da in Folge von EOF die Kammern (35) und (7) leer laufen und somit keine stabile Elektroelution möglich ist.

Fig. 8 zeigt eine spezielle erfinderische Vorrichtung für den Einsatz von Adsorbentien mit magnetischen Eigenschaften. Solche können mittels Dauermagneten (17) an bestimmten Stellen des Reaktionskanals (2) zurückgehalten werden. Dazu muß ein Dauermagnet (17) in die Nähe des Reaktionskanals gebracht werden. Für die Elektroelution bietet sich daher insbesondere an, einen geeigneten Dauermagneten in die Nähe des Probenentragsraumes (10) zu bringen, so daß die Partikel nach Abgabe der geladenen Moleküle z. B. auf den Boden oder an die Seitenwandung gezogen werden können. Durch diese Maßnahme kann die anschließende Elektroelution nicht dadurch beeinträchtigt werden, daß sie Gewebe oder andere Einbauten im Reagenzkanal durch Partikel verstopft werden.

Neben der Elektroelution, (Beispiel 4), können erfindungsgemäße Vorrichtungen auch zur Rückgewinnung von Nukleinsäure aus Gelen (Agarose oder Polyacrylamid) eingesetzt werden (Beispiel 2).

#### Abbildungen

Fig. 1a perspektivische Ansicht: Rechteckiger Reaktionskanal mit Zwischeneinbau,

Fig. 1b Aufsicht: Rechteckiger Reaktionskanal mit Einschnürung,

Fig. 1c Grundelement,

Fig. 1d Zwischeneinbau,

Fig. 1e Dichtelement,

Fig. 1f Elektrodenaufnahme,

Fig. 1g Aufnahme mit Spannvorrichtung,

Fig. 1h Mikrotitrationsrahmen mit 48 Reaktionskanälen,

Fig. 1i Grundelement mit Elektrodenaufnahmen und Klemmung,

Fig. 1j Grundelement mit Öffnung und Klemmung,

Fig. 2a Aufsicht: Reaktionskanal mit Zwischeneinbau,

Fig. 2b Schnitt: Reaktionskanal mit Zwischeneinbau,

Fig. 3 Reaktionskanal mit zwei Zwischeneinbauten,

Fig. 4 Reaktionskanal mit Flüssigkeitssperre,

Fig. 5a Flüssigkeitssperre offen,

Fig. 5b Flüssigkeitssperre geschlossen,

Fig. 6 Reaktionskanal mit Flüssigkeitssperre und Membrane,

Fig. 7a Vorrichtung zur Elektroelution mit formstabilisiertem Gel nach Variante A,

Fig. 7b Vorrichtung zur Elektroelution mit formstabilisiertem Gel nach Variante B,

Fig. 7c Vorrichtung mit drei Kammern,

Fig. 7d Vorrichtung mit zwei formstabilisierten Gelschichten,

Fig. 7e Vorrichtung mit drei formstabilisierten Gelschichten,

Fig. 7f Perspektivische Sicht eines Flächbettgels mit Reaktionskammern,

Fig. 7g Schnitt durch ein Flächbettgel mit Reaktionskammern,

Fig. 8 Reaktionskanal mit Dauermagnet,

Fig. 9a Vorrichtung für Elektroelution,

Fig. 9b Vorrichtung für Elektroelution mit Pritze,

Fig. 9c Vorrichtung für Elektroelution mit Partikeln,

Fig. 10a Agarosegelstückchen vor und nach Elektroelution,

Fig. 10b Agarosegel für Elektroelution mit Vorrichtung Fig. 9a

Fig. 11 Agarosegel für Elektroelution mit Vorrichtung Fig. 9b,

Fig. 12 Agarosegel für Nukleinsäureisolierung aus Hefe mittels Elektroelution in Fig. 9c,

Fig. 13 Standardagarosegel, zur Analyse der Elektroelution nach Beispiel 5,

Fig. 14 Standardagarosegel zur Analyse der Elektroelution nach Beispiel 7,

Fig. 15 Standardagarosegel auf einem Träger aus gesintertem Kunststoff. (Beispiel 10),

Fig. 16 Standardagarosegel zur Analyse der Isolierung genomische DNA und RNA aus Hefe Beispiel 11,

Fig. 17 Standardagarosegel nach PCR mit verschiedenen Elektroeluatien,

Fig. 18 Standardagarosegel zur Analyse der Isolierung genomische DNA aus Hefe vor Amplifikation,

Fig. 19 Standardagarosegel zur Analyse der Isolierung genomische DNA aus Hefe nach Amplifikation,

Fig. 20 Standardagarosegel zur Analyse der Isolierung genomische DNA aus Hefe vor Amplifikation mit Einsatz eines Detergensadsorbers,

Fig. 21 Standardagarosegel zur Analyse der Isolierung genomische DNA und RNA aus Hefe nach Amplifikation mit Einsatz eines Detergensadsorbers,

Fig. 22 Standardagarosegel zur Analyse der Isolierung genomische DNA aus Hefe vor Amplifikation mit Einsatz eines Zweikomponentenpuffersystems,

Fig. 23 Standardagarosegel zur Analyse der Isolierung genomische DNA und RNA aus Hefe nach Amplifikation mit Einsatz eines Zweikomponentenpuffersystems,

Fig. 24 Standardagarosegel zur Analyse der Isolierung genomische DNA aus Hefe nach Amplifikation in einer Kinetik.

## Bezugszeichenliste

- 1 Nach unten geschlossener Grundkörper
- 2 Nach oben offener Kanal
- 3 Elektrode A, z. B. Kathode
- 4 Elektrode B, z. B. Anode
- 5 Gewebe
- 6 Kathodenraum bzw. -kammer
- 7 Probenentnahmeraum bzw. -kammer
- 8 Anodenraum bzw. -kammer
- 9 Klemmkonus bzw. -kammer
- 10 Probeneintragsraum bzw. -kammer
- 11 Elektrophoretrennstrecke
- 12 Führung in Grundkörper für Einbauelemente
- 13 Flüssigkeitssperre
- 14 Semipermeable Membran
- 15 Reaktionsraum bzw. -kammer (offen)
- 16 Rastnase
- 17 Dauermagnet
- 18 Mikrotitrationsplattenrahmen
- 19 Mikrotitrationsplattenstreifen
- 20 Paßfläche
- 21 Integriertes Verbindungselement
- 22 Festphase
- 23 Spannvorrichtung
- 24 Grundelement
- 25 Dichtelement
- 26 Aufnahme
- 27 Fritte
- 28 Zwischeneinbauten
- 29 Laminierfolie
- 30 Elektrische Zuleitung
- 31 Öffnung zum Reaktionskanal
- 32 Einschnürung
- 33 Formstabilisiertes Gel
- 34 Gelschicht
- 35 Reaktionskammer
- 36 Agaroseflachbettgel

## Beispiele

### 1. Messung des elektroosmotischen Flusses

Für diese Anwendung wurde eine Vorrichtung nach **Abb. 9a** mit zwei Geweben (5) [Nr. 07/51 Fa. SEFAR, Rüschlikon, Schweiz] und einer semipermeablen Membran (14) [Size 3; Fa. Medicell Int. Ltd., London, UK] eingesetzt, die dann einen Kathodenraum (6), einen Probeneintragsraum (10) und einen Anodenraum (8) abgrenzen. Dabei wurde die Vorrichtung aus einzelnen Grundelementen nach **Fig. 1c** [Nr.: 011 11120 005 05; J. Pützfeld B. V., Amsterdam, Niederlande] zusammengesetzt. Für Anoden- und Kathodenraum wurden jeweils 3 Elemente verklebt, das Gewebe (5) und die semipermeable Membran (14) wurden jeweils in eine gelochte Laminierfolie [250 µm Dicke, Nr. 54 x 86; Fa. Böttcher, Jena] mit einem Laminiergerät [Fa. Lamirel MAXIPLAST 335 E] eingeschweißt und mit Silikonichtungen [1 mm Dicke Nr. 6084.0810, Fa. H. Wegener, Hamburg] zwischen die o. g. Grundelemente flüssigkeitsdicht mit einer Schraubklemmvorrichtung eingeklemmt. Als Elektroden (3, 4) dienen Aluminiumplättchen und als Stromquelle wurde ein Elektrophorettransformator [Fa. Hölzel] eingesetzt.

Die Vorrichtung wurde mit Elektrophoresepuffer (10 mM Tris/Acetat [Fa. Roth, Karlsruhe], 1 mM EDTA [Fa. Sigma], pH 8,0) befüllt und an die Elektroden (3, 4) eine Spannung von 40–80 V bei konstant 10 mA für 10 min angelegt. Nachfolgende Tabelle zeigt die Volumina in den einzelnen Kammern vor und nach Elektroelution.



	Kathoden- raum (6)	Proben- Eintragsraum (10)	Proben- entnahmeraum (7)
Vor Elektroelution	750 µl	250 µl	250 µl
Nach Elektroelution	870 µl	240 µl	55 µl

Dieses Experiment zeigt die Verringerung des Puffervolumens im Probenentnahmeraum (7). Für alle nachfolgenden Beispiele wurden Materialien wie Beispiel 1. verwendet, falls nicht anders angegeben.

## 2. Elektroelution von DNA aus Agarosegelen

2,5 µg DNA (λ Hind III) [Nr. #SM0101; MBI Fermentas, St. Leon-Roth] wurde in ein Standard-Flächbettagarosegel (0,8% Agarose [Fa. Sigma, München]) in einem Elektrophoresepuffer (s. o.) mit Laufzeit von 10 min. (ca. 3 V/cm) in das Gel überführt, und die Bande nach Standardvorschrift mit SYBR® Gold [S-11494; Fa. Mo Bi Tec, Göttingen] angefärbt. Das korrespondierende, die DNA enthaltende Gelstückchen wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und ist in Abb. 10a vor und nach Elektroelution dargestellt.

Das ausgeschnittene Agarosegel wurde in den Probeneintragsraum gebracht und die gesamte Vorrichtung nach Abb. 9a wurde mit 1,9 ml Elektrophoresepuffer (s. o.) gefüllt. An die Elektroden wurde mit einem Elektrophoretentransformator eine Spannung zwischen 40–60 V bei konstant 10 mA für 7 bzw. 10 min. angelegt.

Fig. 10b zeigt das Ergebnis der Elektroelution in einem Standardagarosegel (s. o.):

Spur	Inhalt
1	Inhalt Probeneintragsraum nach 7 min Elution
2	Inhalt Probenentnahmeraum nach 7 min Elution
3	Inhalt Probeneintragsraum nach 10 min Elution
4	Inhalt Probenentnahmeraum nach 10 min Elution
5	Marker : λ Hind III: 23,1   9,4   6,6   4,4   2,3   2,0   0,56   KB

## 3. Elektroelution mit einer Vorrichtung nach Abb. 9b

Für diese Anwendung wurde eine Vorrichtung nach Abb. 9b mit einem Gewebe (5), einer Fritte aus gesintertem Kunststoff [Nr. XS-5616, Fa: Porex. Technologies GmbH; Singwitz] und einer semipermeablen Membran (14) eingesetzt, die dann einen Kathodenraum (6), einen Probeneintragsraum (10) und einen Anodenraum (8) abgrenzen. Dabei wurde die Vorrichtung zusammengesetzt wie in Beispiel 1 beschrieben.

2,5 µg DNA (λ Hind III) wurde direkt in den Probeneintragsraum gebracht und die gesamte Vorrichtung nach Abb. 9b wurde mit 1,75 ml Elektrophoresepuffer (siehe Beispiel 1) gefüllt. An die Elektroden wurde mit einem Elektrophoretentransformator eine Spannung von 70 V bei konstant 10 mA für 10 min. angelegt.

Fig. 11 zeigt das Ergebnis der Elektroelution in einem Standardagarosegel (s. o.) mit Entnahmen aus Probeneintragsraum und unmittelbar daneben Probenentnahmeraum in einer Kinetik von 0–10 min. M bezeichnet die Spur des Markers wie in Beispiel 1.

## 4. Isolierung von Nukleinsäure aus Hefe mittels Magnetartikeln und Elektroelution

Für diese Anwendung wurde eine Vorrichtung mit einem Gewebe (5) [Fa. SEFAR siehe Beispiel 1] und einer Dialysemembran [Fa. Medicell siehe Beispiel 1] wie in Fig. 9c verwendet.

1 × 10<sup>10</sup> Hefezellen pro ml (*Saccharomyces cerevisiae*) wurden in Lyticasepuffer (1M Sorbit [Fa. AppliChem, Darmstadt], 100 mM Natriumcitrat [Fa. ICN; Aurora, USA], 60 mM EDTA [Fa. Sigma], 50 mM Dithioerythrit [Fa. Roth], pH 7,5) aufgenommen und 10 µl (10<sup>8</sup> Zellen) davon mit 1 µl Lyticase [Nr. 1372 467, Roche Diagnostics, Mannheim] versetzt und 15 min bei 37°C inkubiert.

Die Lyse sowie die Bindung und das Waschen der Magnetpartikel erfolgten nach US 5 7605 628. Nach dem letzten Waschschritt wurden die Magnetpartikel abgetrennt, die Waschlösung sorgfältig entfernt und die Partikel in 150 µl Elu-

tionspuffer (Elektrophoresepuffer siehe Beispiel 1) aufgenommen. Anschließend wurde die Suspension in die Probeneintragskammer (in diesem Falle identisch mit dem Kathodenraum (6)) einer bereits mit Elutionspuffer befüllten Vorrichtung nach Fig. 9c gefüllt. Die Elektroelution erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 40–70 V bei 10 mA Stromfluß für 5 min. Die Nukleinsäure wurde aus der Entnahmekammer pipettiert und einer Agarosegelelektrophorese wie in Beispiel 1 unterworfen. Fig. 12 zeigt das dazugehörige Gelbild.

Spur	Inhalt
1	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution
2	Probeneintragsraum (10) nach Elektroelution
3	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution
4	Marker ( $\lambda$ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0  0,56 KB

### 5. Elektroelution mit einer Vorrichtung nach Fig. 7a

Für diese Anwendung würde eine Vorrichtung nach Fig. 7a mit einem Gewebe (5) [Nr. 07/5/1 Fa. SEFAR, Rüschlikon, Schweiz] und einer semipermeablen Membran (14) [Size 3; Fa. Medicell Int. Ltd., London, UK] eingesetzt, die, zunächst einen Kathodenraum (6) und einen Anodenraum (8) abgrenzen. Darüber hinaus ist zwischen diesen beiden Einbauten ein formstabilisiertes Gel (33) eingebracht, das einen Probeneintragsraum (10) und einen Probenentnahmeraum (7) mit jeweils ca. 250  $\mu$ l Volumen abgrenzt. Dabei wurde die Vorrichtung aus einzelnen Grundelemente [Nr.: 011 1120 005 05 J. Pützfeld, B: V., Amsterdam, Niederlande] zusammengesetzt. Für Anoden- (8) und Kathodenraum (6) wurden jeweils 3 Elemente mit einem Volumen von ca. 750  $\mu$ l verklebt, das Gewebe (5) und die semipermeable Membran (14) wurden jeweils in eine gelochte Laminierfolie [250  $\mu$ m Dicke, Nr. 54  $\times$  86; Fa. Böttcher, Jena] eingeschweißt mit einem Laminiergerät [Fa. Lamirel MAXIPLAST 335 E] und mit Silikondichtungen [1 mm Dicke Nr. 6084.0810, Fa. H. Wegener, Hamburg] zwischen die. o. g. Elemente flüssigkeitsdicht mit einer Schraubklammervorrichtung eingeklemmt.

Nach Variante A wurde das Gel wie folgt formstabilisiert: Ein gesinterter Kunststoff [Porenweite 45–90  $\mu$ m, Nr. X-4899, Fa. Porex, Singwitz] wurde in einer erwärmten Mischung aus Agarose (0,4%–3%) [Fa. Sigma, München] und Elektrophoresepuffer 10 mM Tris/Acetate [Fa. Roth, Karlsruhe] mit 1 mM EDTA [Fa. Sigma] pH 8; 0) gelegt; die Agarose wurde fest werden lassen und das so formstabilisierte Gel (33) wurde in die Vorrichtung nach Fig. 7a eingebracht.

2,5  $\mu$ g DNA ( $\lambda$  Hind III) [Nr. #SM0101; MBI Fermentas, St. Leon-Rot] wurde direkt in den Probeneintragsraum gebracht und die gesamte Vorrichtung wurde mit 1,75 ml Elektrophoresepuffer (siehe zuvor) gefüllt. An die Elektroden wurde mit einem Elektrophoresetransformator [Fa. Hölzel, Dorfen] eine Spannung von 50–500 V bei konstant 10 mA für 10 min. angelegt.

Fig. 13 zeigt das Ergebnis der Elektroelution mit verschiedenen Agarosekonzentrationen im formstabilisierten Gel, wobei in einer Kinetik von 0–10 min sowohl Entnahmen aus Probeneintragsraum (10) als auch aus dem Probenentnahmeraum (7) mittels einem 0,8% Standardagarosegel (s. o.) analysiert wurden:

Agarose-konz in formstabil. Gel (33)	Gelspuren
	Marker ( $\lambda$ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0  0,56 KB
0,4 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 0 min.
0,4 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 0 min
0,4 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 1 min.
0,4 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 1 min
0,4 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 2 min.
0,4 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 2 min
0,4 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 3 min.
0,4 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 3 min
0,4 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 4 min.
0,4 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 4 min
0,4 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 5 min.
0,4 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 5 min
0,4 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 7 min.
0,4 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 7 min
0,4 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 10 min.
0,4 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 10 min
	Marker ( $\lambda$ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0  0,56 KB
0,8 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 0 min.
0,8 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 0 min
0,8 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 1 min.
0,8 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 1 min
0,8 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 2 min.
0,8 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 2 min
0,8 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 3 min.
0,8 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 3 min
0,8 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 4 min.
0,8 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 4 min
0,8 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 5 min.
0,8 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 5 min

	0,8 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 7 min.
5	0,8 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 7 min
	0,8 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 10 min.
	0,8 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 10 min
10		Marker ( $\lambda$ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0  0,56 KB
	1,2 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 0 min.
15	1,2 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 0 min
	1,2 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 1 min.
	1,2 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 1 min
20	1,2 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 2 min.
	1,2 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 2 min
25	1,2 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 3 min.
	1,2 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 3 min
	1,2 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 4 min.
30	1,2 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 4 min
	1,2 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 5 min.
35	1,2 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 5 min
	1,2 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 7 min.
	1,2 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 7 min.
40	1,2 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 10 min.
	1,2 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 10 min
45		Marker ( $\lambda$ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0  0,56 KB
	3,0 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 0 min.
	3,0 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 0 min
50	3,0 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 1 min.
	3,0 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 1 min
	3,0 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 2 min.
55	3,0 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 2 min
	3,0 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 3 min.
60	3,0 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 3 min
	3,0 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 4 min.
	3,0 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 4 min
65	3,0 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 5 min.

3,0 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 5 min
3,0 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 7 min.
3,0 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 7 min
3,0 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 10 min.
3,0 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 10 min

Man erkennt die Abnahme der Menge an DNA ( $\lambda$  Hind III) im Probeneintragsraum (10) und die Zunahme im Probenentnahmeraum (7). Darüber hinaus werden die Banden mit kleinerem Molekulargewicht bei höheren Agarosekonzentrationen zurückgehalten, so daß auf diese Art und Weise mit einem formstabilisiertem Gel eine Selektionierung von bestimmten Nukleinsäuren erreicht werden kann.

#### 6. Messung des elektroosmotischen Flusses mit einer Vorrichtung nach Fig. 7a

Für diese Anwendung wurde eine Vorrichtung nach Fig. 7a und mit einem formstabilisierten Gel der Variante A mit 0,8% Agarose betrieben. Alle weiteren experimentellen Bedingungen sind wie Beispiel 1.

Die Endvolumina des Probeneintragsraums (10) und des Probenentnahmeraums (7) sind in einer Kinetik von 2–10 min. in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

<i>Zeit [min.]</i>	<i>Volumen in <math>\mu</math>l</i> <i>Probeneintragsraums (10)</i>	<i>Volumen in <math>\mu</math>l</i> <i>Probenentnahmeraums (7)</i>
2	263	237
5	244	230
7	133	203
10	71	150

Durch Einsatz eines formstabilisierten Gels verringert sich das Volumen in dem Probenentnahmeraums (7), so daß die eluierte Nukleinsäure entsprechend aufkonzentriert wird.

#### 7. Elektroelution mit einer Vorrichtung nach Fig. 7b

Für diese Anwendung wurde eine Vorrichtung nach Fig. 7b eingesetzt, die ein formstabilisiertes Gel nach Variante B enthält. Die Herstellung wurde wie folgt durchgeführt:

Zwei Lagen Gewebe (5) in einem Abstand von ca. 2 mm in die Vorrichtung gebracht und der Zwischenraum wurde mit einer erwärmten Mischung aus Agarose (0,4%) und Elektrophoresepuffer befüllt. Die Agarose wurde erkalten und somit fest werden lassen.

2,5  $\mu$ g DNA ( $\lambda$  Hind III) wurde direkt in den Probeneintragsraum (10) gebracht und die gesamte Vorrichtung wurde wie Beispiel 5 betrieben und das Resultat aus der Probenentnahmekammer (7) entnommen und analysiert. Fig. 14 zeigt das Ergebnis der Elektroelution, wobei sowohl Entnahmen aus Probeneintragsraum (10) als auch aus dem Probenentnahmekammer (7) mittels einem 0,8% Standardagarosegel (s. o.) in einer Elutions-Kinetik von 0–10 min analysiert wurden.

Agarose-konz in formstabil. Gel (33)	Gelspuren
	Marker ( $\lambda$ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0  0,56 KB
0,4 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 0 min.
0,4 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 0 min
0,4 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 1 min.
0,4 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 1 min
0,4 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 2 min.
0,4 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 2 min
0,4 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 3 min.
0,4 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 3 min
0,4 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 4 min.
0,4 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 4 min
0,4 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 5 min.
0,4 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 5 min
0,4 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 7 min.
0,4 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 7 min
0,4 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 10 min.
0,4 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 10 min

Das Ergebnis entspricht den Daten in Beispiel 5.

#### 8. Messung des elektroosmotischen Flusses mit einer Vorrichtung nach Fig. 7b

Für diese Anwendung wurde eine Vorrichtung nach Fig. 7b und Beispiel 7 mit einem formstabilisierten Gel der Variante B mit 0,4% Agarose eingesetzt. Die gesamte Vorrichtung nach Fig. 7b wurde wie Beispiel 1 betrieben.

Die Endvolumina des Probeneintragsraums (10) und des Probenentnahmekammer (7) sind nach 10 min. in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Zeit [min.]	Volumen in $\mu$ l Probeneintragsraums (10)	Volumen in $\mu$ l Probenentnahmekammer (7)
0	250	250
10	320	>10

Durch Einsatz eines formstabilisierten Gels verringert sich das Volumen in dem Probenentnahmekammer (7), so daß die eluierte Nukleinsäure entsprechend aufkonzentriert wird.

#### 9. Elektroelution mit einer Vorrichtung nach Fig. 7c mit geringeren Stromspannungen

Für diese Anwendung wurde eine Vorrichtung nach Fig. 7c und Beispiel 5 mit einem formstabilisierten Gel (33) der Variante A mit 0,8% Agarose eingesetzt. Die gesamte Vorrichtung im Gegensatz zu Beispiel 5 betrieben mit einer 10fach konzentrierten Elektrophoresepuffer im Anodenraum (6). 10 mA wurden bei dieser Anordnung mit einer Spannung von 20–25 V erreicht. Die Volumina wurden vor und nach Elektroelution wie folgt bestimmt:

Zeit [min.]	Volumen in $\mu\text{l}$ Kathodenraums (2)	Volumen in $\mu\text{l}$ Probenentnahmeraums (8)
0	750	250
10	766	232

Dieses Beispiel zeigt bei niedrigem Spannungsbereich für die Elektroelution ein Minimum an elektroosmotischen Fluß, was für einige Anwendungen auch von Vorteil sein kann.

Dieses Ergebnis zeigt, daß mit erheblich geringerer Stromspannung eine Elektroelution durchgeführt werden kann, was bei einer entsprechenden Automatisierung eine erhebliche Vereinfachung darstellt, da für diese Stromspannungen anderen Sicherheitsrichtlinien gelten. Werden Anodenraum und Kathodenraum wie in Beispiel 11 mit Puffer höherer Konzentration beschickt, so erniedrigt sich die Spannung auf unter 10 V.

#### 10. Einsatz eines Agarosegels auf einem Träger aus gesintertem Kunststoff

Ein Standardagarosegel (0,8%) wurde auf einen gesinterten Kunststoff [X 4588, Fa. Porex, Singwitz] gegossen und erkalten lassen. Mit diesem Gel wurde DNA ( $\lambda$  Hind III) aufgetragen, eine Elektrophorese durchgeführt und angefärbt (s. o.). Fig. 15 zeigt das Ergebnis.

#### 11. Elektroelution mit einer Vorrichtung nach Fig. 7f in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS)

Für diese Anwendung wurde eine Vorrichtung nach Fig. 7f mit einer Dialysemembran (14) [Fa. Medicell siehe Beispiel 1] und zwei formstabilisierten Gelen (33 und 33a) verwendet. Dabei war die Agarose-Konzentration in (33) 0,2% und in (33a) 2% mit Formstabilisierung nach Variante A.

30  $\mu\text{l}$  ( $10^8$  Zellen) einer Hefezellsuspension (*Saccharomyces cerevisiae*) wurden mit 115  $\mu\text{l}$  BILATEST-Lysepuffer I bestehend aus 5% Natriumdodecylsulfat [L4390 Fa. Sigma, München], 100 mM Tris/HCl [T2584 L4390 Fa. Sigma, München], 10 mM EDTA [E5134 Fa. Sigma, München] und 5  $\mu\text{l}$  einer Proteinase K-Lösung [1 373 196; Fa. Roche, Mannheim] 1 Stunde bei 55°C inkubiert und in die Probeneintragskammer (10) überführt.

Anoden- (8) und Kathodenraum (6) wurden jeweils beide mit 600  $\mu\text{l}$  eines 10fach konzentrierten Elektrophoresepuffers wie Beispiel 1 und die übrige Kammern (7) mit 150  $\mu\text{l}$  eines 1fach Konzentrats befüllt.

Die Elektroelution erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 7,5 V bei 10 mA Stromfluß für 5 min bzw. 10 min durchgeführt. Die Nukleinsäure wurde aus der Entnahmekammer (7) pipettiert und einer Agarosegelelektrophorese wie in Beispiel 1 unterworfen. Fig. 16 zeigt das dazugehörige Gelbild.

Spur	Inhalt
M	Marker ( $\lambda$ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0  0,56 KB
0-	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution

5-	Probeneintragsraum (10) nach Elektroelution für 5 min.
5+	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution für 5 min.
10-	Probeneintragsraum (10) nach Elektroelution für 10 min.
10+	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution für 10 min.
M	Marker ( $\lambda$ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0  0,56 KB

Das Gelbild zeigt die genomische DNA sowie RNA.

#### 12. Abreicherung von Natriumdodecylsulfat mittels Elektroelution

Bei diesem Experiment wurde eine Vorrichtung nach Fig. 7f mit einem analogen Aufbau wie Beispiel 11 eingesetzt. Formstabilisiertes Gel (33) wurde mit 0,4% Agarose und (33a) mit 4% Agarose hergestellt. In die Probeneintragskammer (10) wurde eine Natriumdodecylsulfatlösung in Elektrophorese-puffer (siehe zuvor) in einer Konzentration von 0,1% bzw. 1% eingesetzt und einer Elektroelution wie in Beispiel 11 unterworfen. Danach wurden 1  $\mu\text{l}$  der Lösungen aus Probeneintragskammer (10), Probenentnahmekammer (7) und der Anodenkammer (8) zu einer Standard-PCR des BCY-Gens der Hefe geben, wie in Beispiel 13 näher beschrieben.

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegel analysiert und Fig. 17 zeigt das Ergebnis.

<i>Spur</i>	<i>Inhalt</i>
V	Zugabe von 1 $\mu$ l aus Probeneintragsraum (10) zur PCR bei 0,1 % SDS Ausgangskonzentration Frei
	Zugabe von 10 $\mu$ l aus Probeneintragsraum (10) zur PCR bei 0,1 % SDS Ausgangskonzentration
N	Zugabe von 1 $\mu$ l aus Probenentnahmeraum (7) zur PCR bei 0,1 % SDS Ausgangskonzentration Frei
	Zugabe von 10 $\mu$ l aus Probenentnahmeraum (7) zur PCR bei 0,1 % SDS Ausgangskonzentration
+	Zugabe von 1 $\mu$ l aus Anodenraum (8) zur PCR bei 0,1 % SDS Ausgangskonzentration



	Zugabe von 10 µl aus Anodenraum (8) zur PCR bei 0,1 % SDS Ausgangskonzentration	
V	Zugabe von 1 µl aus Probeneintragsraum (10) zur PCR bei 1 % SDS Ausgangskonzentration  Zugabe von 10 µl aus Probeneintragsraum (10) zur PCR bei 1 % SDS Ausgangskonzentration	
N	Zugabe von 1 µl aus Probenentnahmeraum (7) zur PCR bei 1 % SDS Ausgangskonzentration  Zugabe von 10 µl aus Probenentnahmeraum (7) zur PCR bei 1 % SDS Ausgangskonzentration	
+	Zugabe von 1 µl aus Anodenraum (8) zur PCR bei 1 % SDS Ausgangskonzentration  Zugabe von 10 µl aus Anodenraum (8) zur PCR bei 1 % SDS Ausgangskonzentration	
Kontrolle	Zugabe von 1 µl einer 0,1 % SDS-Lösung zur PCR Zugabe 10 µl einer 0,1 % SDS-Lösung zur PCR Zugabe von 1 µl einer 1 % SDS-Lösung zur PCR Zugabe von 10 µl einer 1 % SDS-Lösung zur PCR	

Das Ergebnis zeigt, daß 1 µl einer 0,1%igen SDS-Lösung die PCR nicht stört (Kontrolle), während alle höheren SDS-Mengen kein PCR-Produkt mehr zulassen. Dagegen können in diesem Beispiel nach Elektroelution aus der Probenentnahmekammer infolge der SDS-Abreicherung 1 µl einer 1% SDS-Lösung ohne Störung auf die PCR eingesetzt werden.

### 13. Einfache Isolierung von DNA aus Hefe mit anschließender Amplifikation

Für diese Anwendung wurde eine Vorrichtung nach Fig. 7f mit einer Dialysemembran (14) [Fa. Medicell siehe Beispiel 1] und zwei formstabilisierten Gelen (33 und 33a) verwendet. Dabei war die Agarose-Konzentration jeweils 0,15% in (33) und in (33a) mit Formstabilisierung nach Variante A.

30 µl ( $10^8$  Zellen) einer Hefezellsuspension (*Saccharomyces cerevisiae*) wurden mit 115 µl BILATEST-Lysepuffer I bestehend aus 2% Natriumdodecylsulfat [L4390 Fa. Sigma, München], 100 mM Tris/HCl [T2584 L4390 Fa. Sigma, München], 10 mM EDTA [E5 5134 Fa. Sigma; München] und 5 µl einer Proteinase K-Lösung [1 373 196, Fa. Roche, Mannheim] 1 Stunde bei 55°C inkubiert und in die Probeneintragskammer (10) überführt.

Anoden- (8) und Kathodenraum (6) wurden jeweils beide mit 600 µl eines 10fach konzentrierten Elektrophoresepuffers wie Beispiel 1 und die übrigen Kammern (7) mit 150 µl eines 1fach Konzentrats befüllt.

Die Elektroelution erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 7,5 V bei 10 mA Stromfluß für 2 min durchgeführt. Die Nukleinsäure wurde aus der Entnahmekammer (7) pipettiert und einer Agarosegelelektrophorese wie in Beispiel 1 unterworfen. Fig. 18 zeigt das dazugehörige Gelbild.

Spur	Inhalt
M	Marker ( $\lambda$ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0  0,56 KB
1	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution
2	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution für 2 min.
3	Anodenraum (8) nach Elektroelution für 2 min.
M	Marker ( $\lambda$ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0  0,56 KB

Es sei bei diesem Ergebnis daraufhingewiesen, daß keine DNA in der Anodenkammer (8) zu beobachten ist. Überraschenderweise stellt ein formstabilisiertes Gel (33a) zusammen mit einer Anodenkammer (8), befüllt mit einer 10fach höheren Pufferkonzentration wie in der Probenentnahmekammer (10), eine Barriere für die Nukleinsäure dar, vergleichbar zu einer semipermeablen Membran.

Mit dieser isolierten Hefe-DNA wird eine PCR (US 4 683 195) mit den Primern KV 80:

5'-GCG GAT CCT TAA GTC CAA TCG TCA AAA TT-3'

KV102: 5'-GCG AAT TCG TAT CTT CTT TGC CCA AGG AA-3'

[Fa. MWG Biotech AG, Ebersberg bei München] durchgeführt. Mit diesen Primern wird ein 496bp-Fragment aus dem BCY1-Gen der Hefe amplifiziert.

Die PCR-Ansätze enthalten die folgenden Bestandteile:

0,5 µl Primer-Lösung 1 (50 pmol µl<sup>-1</sup> in H<sub>2</sub>O bidest)

0,5 µl Primer-Lösung 2 (50 pmol µl<sup>-1</sup> in H<sub>2</sub>O bidest)

2 µl dNTP-Lösung, Konzentration der Nukleotide je 5 mM (Eurogentec, Seraing, Belgien)

4 µl MgCl<sub>2</sub>-Lösung 25 mM (Eurogentec)

5 µl 10x PCR-Puffer (Eurogentec)

0,5 u Taq-Polymerase (Eurogentec)

bis zu 30 µl DNA- oder Probenlösung

in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Während des Ansatzes wird die PCR-Platte auf 4°C gekühlt. Nach Zugabe der letzten Lösung werden die Proben einmal mit einer Pipette gemischt. Die PCR wird in Thermo Sprint-Platten [Fa. Innova GmbH, Mainheim] im Primus 96 Plus [MWG Biotech AG, München] durchgeführt. Das Programm umfasst die folgenden Schritte:

Deckelheizung auf 110°C

3 min 94°C

27 Zyklen mit

– 30 s 94°C,

– 30 s 50°C

– 2 min 72°C

5 min 72°C

Kühlung auf 4°C.

Nach der PCR werden die Proben mit 15–20% Gel-Ladepuffer mit EDTA [Sigma, München] versetzt. Die Amplifikate wurde auf einem Standardagarosegel (1,6%) analysiert. Fig. 19 zeigt das Ergebnis.

Spur	Inhalt
M	Marker ( $\lambda$ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0  0,56 KB
1	PCR mit Probe aus Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution
2	PCR mit Probe aus Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution für 2 min.
3	PCR mit Probe aus Anodenraum (8) nach Elektroelution für 2 min.
M	Marker ( $\lambda$ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0  0,56 KB

Es wurde in diesem Experiment ohne Waschschritt genomische Hefe-DNA aus einer SDS-haltigen Lysemischung mit Elektroelution gewonnen, die im Anschluß direkt in eine PCR eingesetzt wurde.

#### 14. Einfache Isolierung von DNA aus Hefe mit anschließender Amplifikation und Verwendung eines Detergensadsorbers

Für diese Anwendung wurde eine Vorrichtung nach Fig. 7f nach Beispiel 13 durchgeführt. Im Gegensatz zu Beispiel

13 wurde nach Lyse 50 µl Detergens-Adsorber [Roche Diagnostics, Mannheim, Kat. Nr. 1500 678] zugegeben und die resultierende Mischung in die Probeneintragskammer gegeben. Die Elektroelution wurde bei einer Spannung von 10,1 V und 10 mA Strom für 10 min durchgeführt.

Zur Analyse der Amplifikation wurde eine Standardagarosegel durchgeführt (Fig. 20):

Spur	Inhalt
1	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution für 10 min.
2	Anodenraum (8) nach Elektroelution für 10 min.
M	Marker ( $\lambda$ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0  0,56 KB

Anschließend wurde mit den Eluaten eine PCR nach Beispiel 13 durchgeführt und wie oben analysiert (Fig. 21).

Spur	Inhalt
1	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution für 10 min. nach PCR
2	Anodenraum (8) nach Elektroelution für 10 min. nach PCR
M	Marker ( $\lambda$ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0  0,56 KB

15. Einfache Isolierung von DNA aus Hefe mit anschließender Amplifikation und Verwendung eines Zweikomponenten-puffersystems (Tris/HCl- und Phosphatpuffer)

Für diese Anwendung wurde eine Vorrichtung nach Fig. 7f nach Beispiel 13 durchgeführt. Im Gegensatz zu Beispiel 13 wurde nach Lyse 50 µl eines Phosphatpuffers (250 mM pH 7,0) bestehend aus  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  [Merck, Darmstadt, Kat. Nr. 1.06580.1000 bzw. 1.06346.1000] zugegeben und die resultierende Mischung in die Probeneintragskammer gegeben. Die Elektroelution wurde bei einer Spannung von 8,6 V und 10 mA Strom für 10 min durchgeführt.

Zur Analyse vor Amplifikation wurde eine Standardagarosegel durchgeführt (Fig. 22):

Spur	Inhalt
1	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution für 10 min.
2	Anodenraum (8) nach Elektroelution für 10 min.
M	Marker ( $\lambda$ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0  0,56 KB

Anschließend wurde mit den Eluaten eine PCR nach Beispiel 13 durchgeführt und wie oben analysiert (Fig. 23).

Spur	Inhalt
1	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution für 10 min. nach PCR
2	Anodenraum (8) nach Elektroelution für 10 min. nach PCR
M	Marker ( $\lambda$ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0  0,56 KB

16. Einfache Isolierung von DNA aus Hefe mit anschließender Amplifikation und Verwendung eines Zweikomponenten-puffersystems (Tris/HCl- und Citratpuffer)

Für diese Anwendung wurde eine Vorrichtung nach Fig. 7f nach Beispiel 13 durchgeführt. Im Gegensatz zu Beispiel 13 wurde nach Lyse 15 µl eines Citratpuffers (1M pH 4,5) Applichem, Darmstadt, Kat. Nr. A 2337] zugegeben und die resultierende Mischung in die Probeneintragskammer gegeben. Die Elektroelution wurde bei einer Spannung von 8,5 V und 10 mA Strom mit Probenentnahmen von 0–6 min durchgeführt.

Anschließend wurde mit den Entnahmen eine PCR nach Beispiel 13 durchgeführt und wie oben analysiert (Fig. 24).

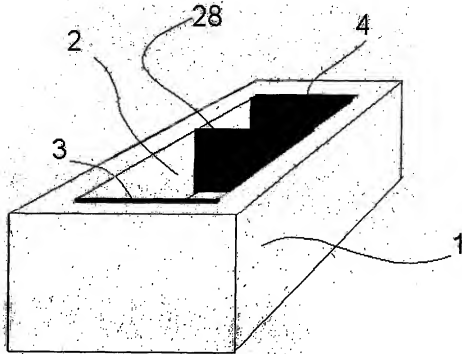
Spur	Inhalt
M	Marker ( $\lambda$ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0  0,56 KB
1	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution für 0 min. nach PCR
2	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution für 0 min. nach PCR
3	Anodenraum (8) nach Elektroelution für 0 min. nach PCR
M	Marker ( $\lambda$ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0  0,56 KB
1	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution für 2 min. nach PCR
2	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution für 2 min. nach PCR
3	Anodenraum (8) nach Elektroelution für 2 min. nach PCR
M	Marker ( $\lambda$ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0  0,56 KB
1	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution für 4 min. nach PCR
2	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution für 4 min. nach PCR
3	Anodenraum (8) nach Elektroelution für 4 min. nach PCR
M	Marker ( $\lambda$ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0  0,56 KB
1	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution für 6 min. nach PCR
2	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution für 6 min. nach PCR
3	Anodenraum (8) nach Elektroelution für 6 min. nach PCR
M	Marker ( $\lambda$ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0  0,56 KB

Dieser Versuch zeigt, daß amplifiziertes Material nur in der Probenentnahmekammer (7) nachgewiesen wurde.

#### Patentansprüche

- Vorrichtung zur Isolierung von elektrisch geladenen Molekülen bestehend aus
  - einem nach unten geschlossenen Grundkörper (1) mit einem nach oben offenen Kanal (2)
  - zwei Elektroden (3, 4) als rechte und linke äußere Begrenzungen des Kanals (2) dadurch gekennzeichnet, daß zwischen den Elektroden (3, 4) im Kanal (2) ein oder mehrere Zwischeneinbauten (28) angeordnet sind, die den Kanal in zwei oder mehr Kammern teilen.
- Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß alle Zwischeneinbauten (28) einerseits eine Flüssigkeitssperre darstellen, andererseits für elektrisch geladene Moleküle durchlässig sind.
- Vorrichtung nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß alle Zwischeneinbauten (28) durch ihre Beschaffenheit den elektroosmotischen Fluß so begrenzen, daß eine Elektroelution von geladenen Molekülen möglich ist.
- Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Zwischeneinbau um ein Gewebe handelt.
- Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Zwischeneinbau um eine Flüssigkeitssperre (13) handelt, die sich öffnen und schließen läßt.
- Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Zwischeneinbau um ein formstabilisiertes Gel (33) handelt.
- Vorrichtung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Gewebe (5) eine Maschenweite von 0,1 bis 50  $\mu$ m, bevorzugt jedoch 0,5 bis 5  $\mu$ m besitzt.
- Vorrichtung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Gewebe (5) in seiner Maschenweite so abgestimmt ist, daß biologisch aktive Partikel definierter Größe nicht durch das Gewebe dringen können.
- Vorrichtung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Absorption der elektrisch geladenen Moleküle an das Gewebe (5) kleiner 40%, bevorzugt jedoch kleiner 10% ist.
- Vorrichtung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Gewebe (5) durch Kalandrieren behandelt wurde.
- Formstabilisiertes Gel für elektrophoretische Zwecke, dadurch gekennzeichnet, daß die Formstabilisierung

- durch ein Stützelement erreicht wird.
12. Formstabilisiertes Gel nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Stützelement aus einem gesinterten Kunststoff besteht.
13. Formstabilisiertes Gel für nach Anspruch 11 und 12, dadurch gekennzeichnet, daß der gesinterte Kunststoff aus Polypropylen oder -äthylen besteht.
14. Formstabilisiertes Gel nach Anspruch 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß der gesinterte Kunststoff eine Porenweite von 1–200 µm, bevorzugt jedoch 20–120 µm besitzt.
15. Formstabilisiertes Gel nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Stützelement aus einem oder mehreren Gewebe(n) besteht.
16. Formstabilisiertes Gel nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das Gewebe aus Polyester oder -amid besteht.
17. Formstabilisiertes Gel nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß das Gewebe eine Maschenweite von 0,1–500 µm, bevorzugt jedoch 0,5–10 µm besitzt.
18. Verwendung des formstabilisierten Gel nach Anspruch 11 bis 17 für das Gelblotting.
19. Verwendung eines formstabilisierten Gels nach Anspruch 11 bis 17 in Vorrichtungen nach Anspruch 1 bis 3.
20. Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 10 und Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß durch elektroosmotischen Fluß das Volumen einer Probenentnahmeräume (10) verringert wird.
21. Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 10 und Anspruch 19 und 20, dadurch gekennzeichnet, daß im Anodenraum (8) und im Kathodenraum (6) ein Puffer mit höherer Konzentration verwendet wird als in den übrigen Kammern.
22. Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 10 und Anspruch 19 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß Puffer mit unterschiedlichem pH-Wert in den Kammern vorgehalten werden.
23. Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 10 und Anspruch 19 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß in den Kammern eine enzymatische Reaktion oder eine Rezeptor/Liganden-Bindung stattfindet.
24. Vorrichtung nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß die enzymatische Reaktion oder eine Rezeptor/Liganden-Bindung während des elektrophoretischen Transfers von geladenen Molekülen stattfindet.
25. Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 10 und Anspruch 19 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß ein elektroosmotischer Fluß von der Anode zur Kathode erzeugt wird, der zu einer Aufkonzentration im Probenentnahmeraum (7) führt.
26. Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 10 und Anspruch 19 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß die Umgebung mindestens einer Elektrode reversibel einem magnetischen Feld ausgesetzt werden kann.
27. Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 10 und Anspruch 19 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß der nach oben offene Kanal eine Verjüngung in der Mitte aufweist.
28. Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 10 und Anspruch 18 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß das Volumen des nach oben offenen Kanals (2) 0,01–5 ml beträgt, bevorzugt jedoch 0,2–2 ml.
29. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 10 und Anspruch 19 bis 28 zur Isolierung von Nukleinsäuren.
30. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 10 und Anspruch 19 bis 29 zur Isolierung von Desoxyribonukleinsäuren (DNA) ohne Kontamination durch Ribonukleinsäuren (RNA).
31. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 10 und Anspruch 19 bis 29 zur Isolierung von Ribonukleinsäuren (RNA) ohne Kontamination durch Desoxyribonukleinsäuren (DNA).
32. Verfahren zur Isolierung von geladenen Molekülen aus lysierten biologischen Proben mit elektrophoretischen Mitteln in einem Reaktionskanal, dadurch gekennzeichnet, daß die lysierte Probe in flüssiger Form in einen Reaktionskanal eingebracht wird, einer Elektrophorese im Reaktionskanal unterworfen wird, bei dieser Elektrophorese im Reaktionskanal weiter prozessiert wird und nach dieser Prozessierung die isolierten geladenen Moleküle in löslicher Form aus dem Reaktionskanal entnommen werden.
33. Verfahren nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß ein oder mehrere formstabilisierte Gele den Reaktionskanal in verschiedene Kammern unterteilen.
34. Verfahren nach Anspruch 32 und 33, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration an Detergens in der entnommenen Lösung mit den isolierten geladenen Molekülen kleiner ist als die Konzentration der ursprünglich in den Reaktionskanal eingebrachten Lösung der lysierten Probe.
35. Verfahren nach Anspruch 32 bis 34, dadurch gekennzeichnet, daß bei der Elektrophorese im Reaktionskanal eine enzymatische Reaktion stattfindet.
36. Verfahren nach Anspruch 32 bis 35, dadurch gekennzeichnet, daß bei der Elektrophorese im Reaktionskanal eine Liganden-Rezeptor-Bindung stattfindet.
37. Verfahren nach Anspruch 32 bis 37, dadurch gekennzeichnet, daß bei der Elektrophorese im Reaktionskanal eine Aufkonzentration stattfindet.
38. Verfahren nach Anspruch 32 bis 37, dadurch gekennzeichnet, daß bei der Elektrophorese der elektroosmotische Fluß so reduziert wird, daß eine Elektroelution von geladenen Molekülen möglich ist.
39. Verfahren nach Anspruch 32 bis 38, dadurch gekennzeichnet, daß zur Lysenmischung eine zweite Pufferkomponente zugegeben wird und danach eine Elektroelution stattfindet.
40. Verwendung eines Verfahrens nach Anspruch 32 bis 39 zur Isolierung von Nukleinsäuren.
41. Verwendung eines Verfahrens nach Anspruch 32 bis 39 zur Isolierung von Desoxyribonukleinsäuren (DNA) ohne Kontamination durch Ribonukleinsäuren (RNA).
42. Verwendung eines Verfahrens nach Anspruch 32 bis 39 zur Isolierung von Ribonukleinsäuren (RNA) ohne Kontamination durch Desoxyribonukleinsäuren (DNA).



**Fig. 1a**

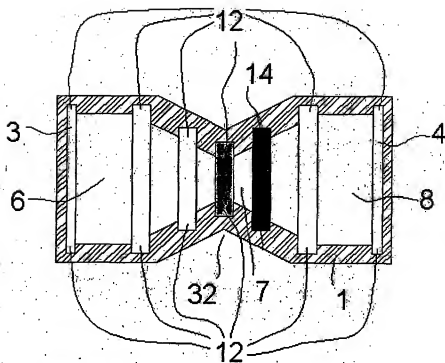


Fig. 1b

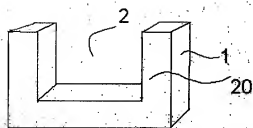


Fig. 1c

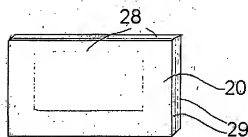


Fig. 1d

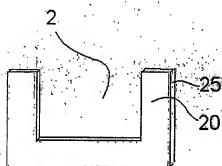


Fig. 1 e

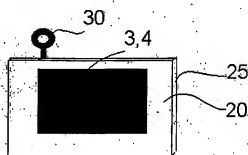


Fig. 1 f

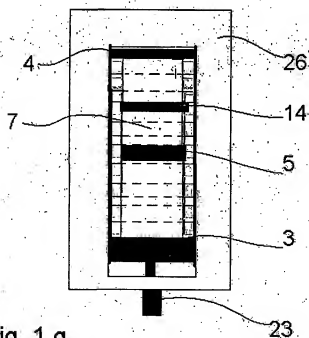


Fig. 1 g



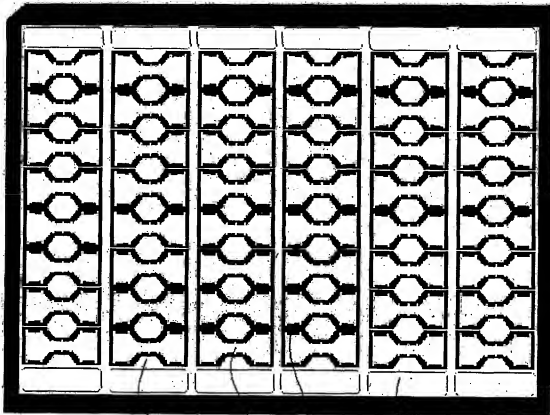


Fig. 1 h

32

2

1

19

18

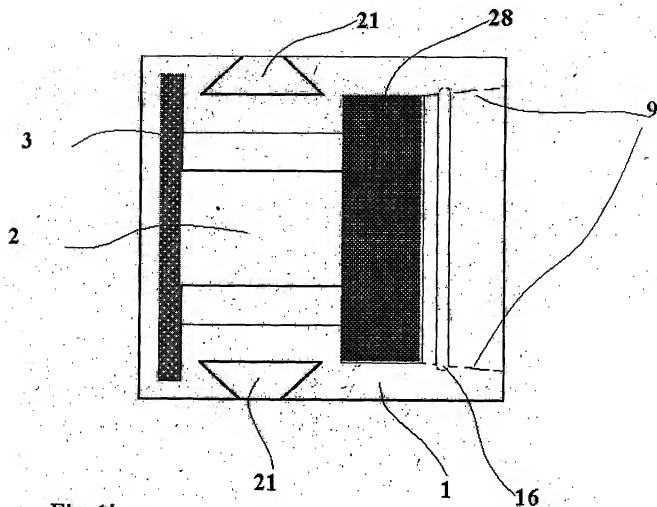
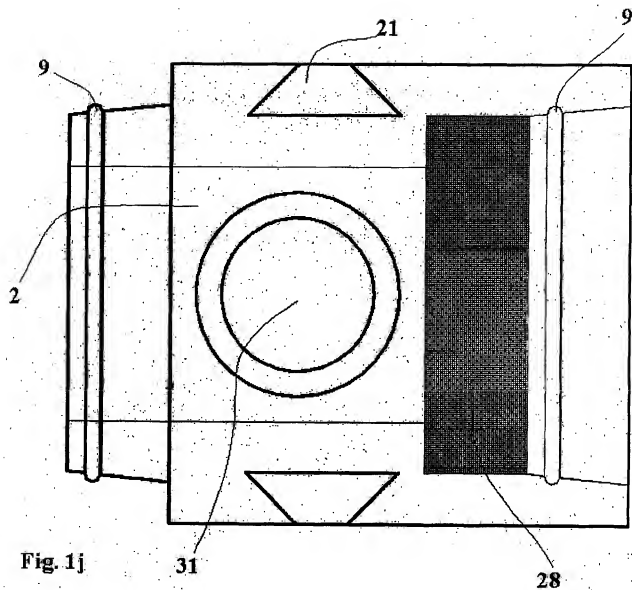


Fig. 1i



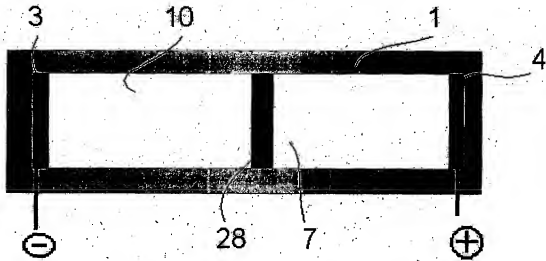


Fig. 2a

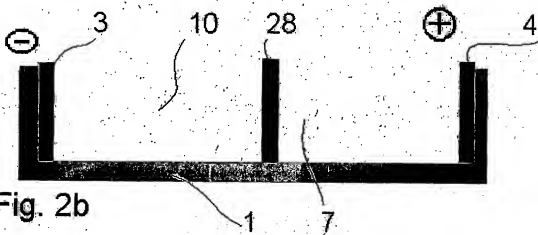
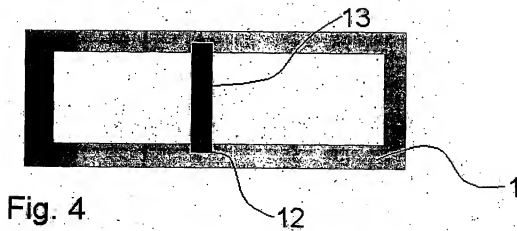
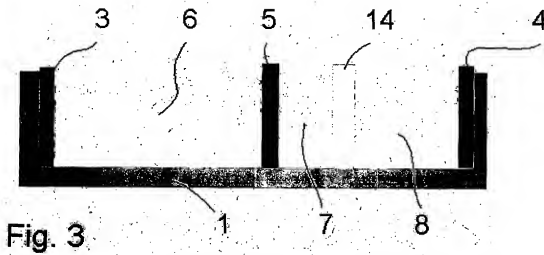


Fig. 2b



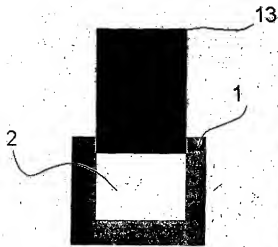


Fig. 5a

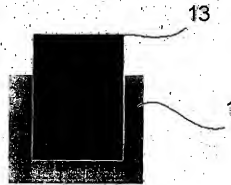


Fig. 5b

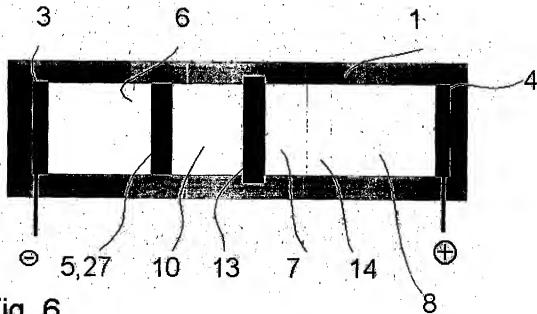


Fig. 6

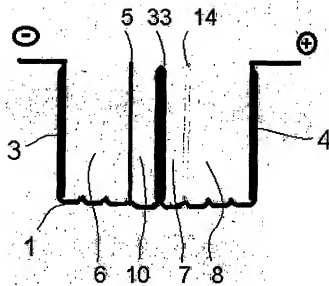


Fig. 7a

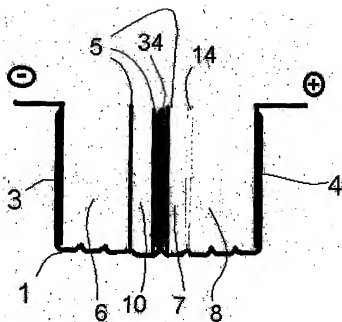


Fig. 7b

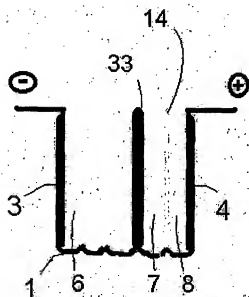


Fig. 7c



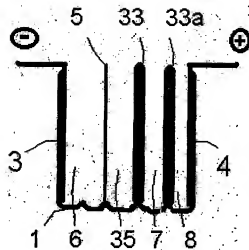


Fig. 7d

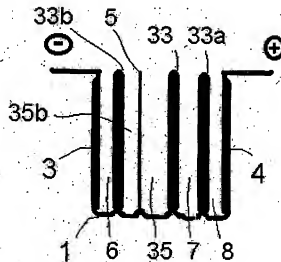


Fig. 7e

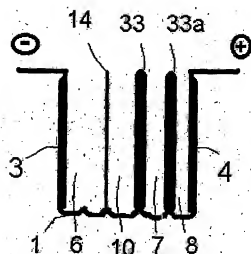


Fig. 7f

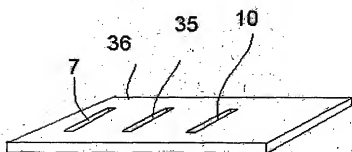


Fig. 7 g

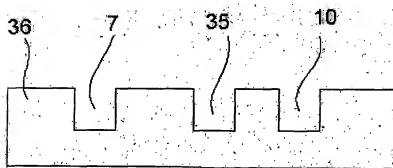


Fig. 7h

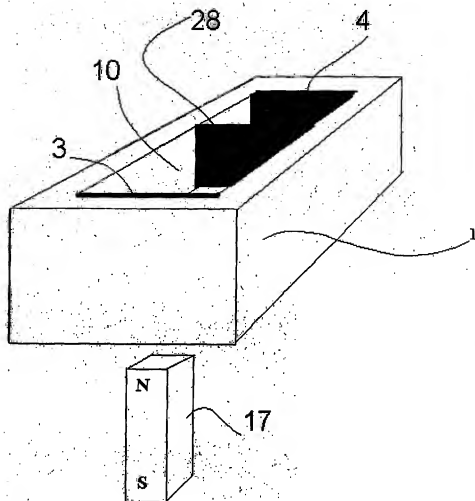


Fig. 8

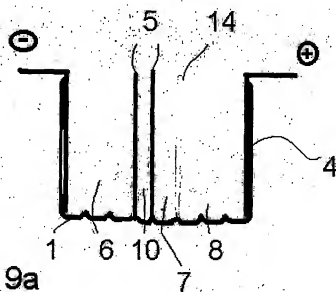


Fig. 9a

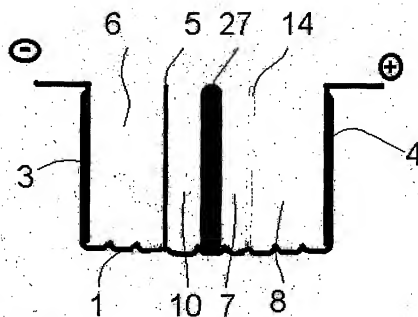


Fig. 9b

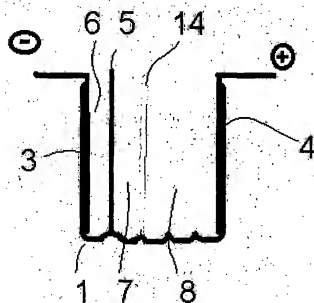


Fig. 9c

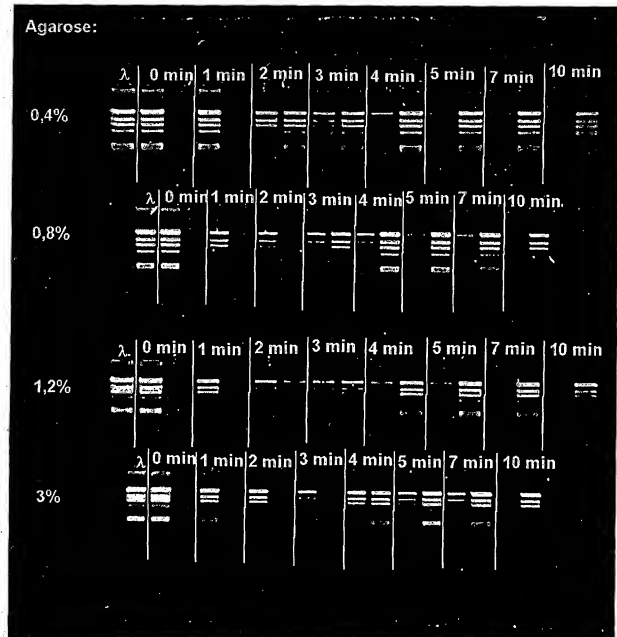


Fig. 13

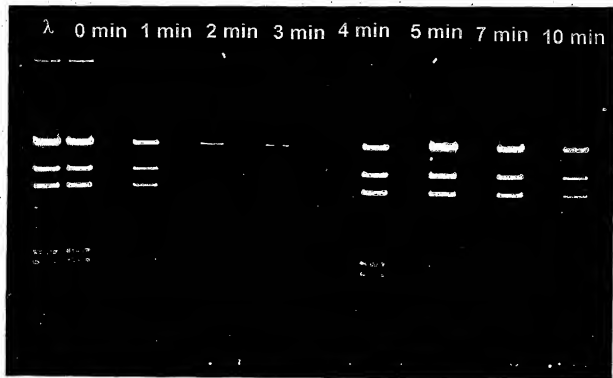


Fig. 14

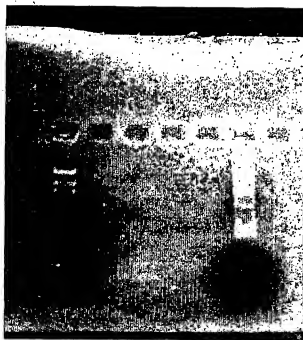


Fig. 15

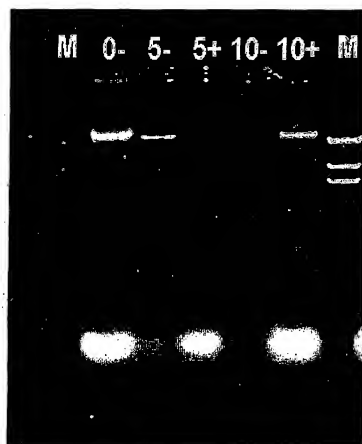


Fig. 16

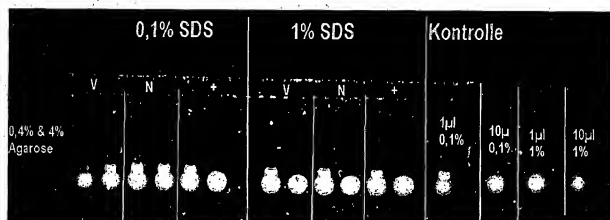


Fig. 17





Fig. 18

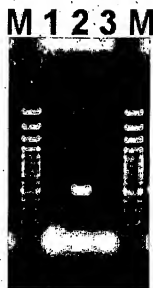


Fig. 19



Fig. 20



Fig. 21



Fig. 22



Fig. 23

t= 0      t=2 min   t= 4 min   t= 6 min  
M 1   2 3 M 1   2 3 M 1   2 3 M 1   2 3 M

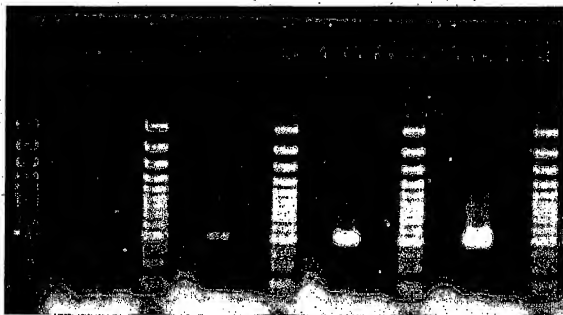


Fig. 24

S1 1 PN= 'DE 19948049'

? t s1/7

1/7/1 [Links](#)

Fulltext available through: [Order File History](#)

Derwent WPI

(c) 2009 Thomson Reuters. All rights reserved.

0009716245 *Drawing available*

WPI Acc no: 2000-000782/200001

Related WPI Acc No: 2001-102291

XRAM Acc no: C2000-000249

**Apparatus for the isolation of electrically charged molecules and especially nucleic acids**

Patent Assignee: BILATEC GES ENTWICKLUNG BIOTECHNOLOGISCH (BILA-N)

Inventor: BERGMANN C; BIENHAUS G; KAPLAN T; LANGE H R

Patent Family ( 2 patents, 1 countries )

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Update	Type
DE 29908807	U1	19991111	DE 29908807	U	19990519	200001	B
DE 19948049	A1	20001207	DE 19948049	A	19990927	200065	E

Priority Applications (no., kind, date): DE 29908807 U 19990519

Patent Details

Patent Number	Kind	Lang	Pgs	Draw	Filing Notes
DE 29908807	U1	DE	28	12	

#### Alerting Abstract DE U1

**NOVELTY** - The apparatus to isolate electrically charged mols. has a base body (1), with a channel (2) closed at the bottom and open at the top. Two electrodes (3,4) define the right and left ends of the channel (2), with one or more woven walls (5) between the electrodes (3,4).

**DESCRIPTION** - The woven walls (5) give an electro-osmotic flow from the anode to the cathode. The walls (5) act as a fluid barrier on one side, but are permeable to electrically charged mols. on the other side. The woven materials (5) have a mesh width of 0.1-50.0 mum and pref. 0.5-5.0 mum, selected to prevent the passage of biological active particles of a defined size through the fabric. The adsorption of the electrically charged mols. at the fabric walls (5) is <=40% and pref. <=10%. The woven fabric walls (5) are finished by calendaring. A fluid barrier, which opens and closes, can be in the channel (2) between the electrodes (3,4). A number of base bodies can be assembled together with a fluid seal between them. A reversible magnetic field can form the environment for at least one electrode. The channel (2), open at the top, can be rectangular or cylindrical, and can have a center taper. The channel (2) has a vol. capacity of 0.01-5.0 ml, and pref. 0.2-2.0 ml.

**USE** - The apparatus is especially for the isolation of nucleic acids.

**ADVANTAGE** - The apparatus gives automation in a unit which is open at the top, using an electro-osmotic flow. The walls with the adsorbed material can be placed in a sample chamber for an electro elution with sample concentrations.

**DESCRIPTION OF DRAWINGS** - The drawing shows a perspective view of the apparatus.

1 base body  
2 channel  
3,4 electrodes  
5 woven walls

**Title Terms** /Index Terms/Additional Words: APPARATUS; ISOLATE; ELECTRIC; CHARGE; MOLECULAR; NUCLEIC; ACID

#### Class Codes

##### International Patent Classification

IPC	Class Level	Scope	Position	Status	Version Date
B01D-0057/00	A	I		R	20060101
B01D-0057/02	A	I		R	20060101
G01N-0027/447	A	I		R	20060101
B01D-0057/00	C	I		R	20060101
B01D-0057/02	C	I		R	20060101
G01N-0027/447	C	I		R	20060101

**ECLA:** B01D-057/00, B01D-057/02, G01N-027/447B3B

File Segment: CPI

DWPI Class: B04; D16; J01

Manual Codes (CPI/A-N): B04-E01; B11-C08D; B11-C08E; B12-K04; D05-H09; J01-C03

#### Original Publication Data by Authority

#### Germany

**Publication No.** DE 19948049 A1 (Update 200065 E)

Publication Date: 20001207

**Vorrichtung und Verfahren zur Isolierung von elektrisch geladenen Molekulan**

Assignee: BILATEC Gesellschaft zur Entwicklung biotechnologischer Systeme mbH, 07407 Rudolstadt, DE (BILA-N)

Inventor: Bergmann, Clemens, Dr., 07745 Jena, DE

Kaplan, Thomas, Dr., 07407 Rudolstadt, DE

Bienhaus, Gerhard, Dr., 82407 Wielenbach, DE

Lange, Hans R., 68623 Lampertheim, DE

Language: DE

Application: DE 19948049 A 19990927 (Local application)

Priority: DE 29908807 U 19990519 (Utility priority)

Original IPC: G01N-27/447(A)

Current IPC: B01D-57/00(R,A,I,M,EP,20060101,20051008,A) B01D-57/00(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) B01D-57/02(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) B01D-57/02(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) G01N-27/447(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) G01N-27/447(R,I,M,EP,20060101,20051008,C)

Current ECLA class: B01D-57/00 B01D-57/02 G01N-27/447B3B

Original Abstract: Vorliegende Anmeldung beschreibt eine nach oben offene Vorrichtung (Fig. 1a) zur Isolierung von geladenen Molekullen in einem Reaktionskanal mit Elektroden an den Enden und verschiedenen Zwischeneinbauten. Die Vorrichtung ist insbesondere für die Automatisierung in einem x,y,z-Roboter ausgelegt. Darüber hinaus werden Verfahren beschrieben, die während des elektrophoretischen Transfers weitere Prozessierung der Umgebung der Proben ermöglicht und z. B. für die Gewinnung von RNAfreier DNA oder DNAfreier RNA eingesetzt werden kann.

Claim:

- 1. Vorrichtung zur Isolierung von elektrisch geladenen Molekullen bestehend aus
  - - einem nach unten geschlossenen Grundkörper (1) mit einem nach oben offenen Kanal (2)
  - - zwei Elektroden (3, 4) als rechte und linke äussere Begrenzungen des Kanals (2) **dadurch gekennzeichnet**, dass zwischen den Elektroden (3, 4) im Kanal (2) ein oder mehrere Zwischeneinbau(ten) (28) angeordnet sind, die den Kanal in zwei oder mehr Kammern teilen.

**Publication No.** DE 29908807 U1 (Update 200001 B)

**Publication Date:** 19991111

**Vorrichtung zur Isolierung von elektrisch geladenen Molekuehlen**

**Assignee:** BILATEC Gesellschaft zur Entwicklung biotechnologischer Systeme mbH, 07407 Rudolstadt, DE (BILA-N)

**Language:** DE (28 pages, 12 drawings)

**Application:** DE 29908807 U 19990519 (Local filing Utility Model)

**Original IPC:** B01D-57/00(A) B01D-61/42(B)

**Current IPC:** B01D-57/00(R,A,I,M,EP,20060101,20051008,A) B01D-57/00(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) B01D-57/02(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) B01D-57/02(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) G01N-27/447(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) G01N-27/447(R,I,M,EP,20060101,20051008,C)

**Current ECLA class:** B01D-57/00 B01D-57/02 G01N-27/447B3B

**Claim:**

- 1. Vorrichtung zur Isolierung von elektrisch geladenen Molekuelen bestehend aus
  - 1. einem nach unten geschlossenen Grundkoerper (1) mit einem nach oben offenen Kanal (2)
  - zwei Elektroden (3, 4) als rechte und linke äussere Begrenzungen des Kanals (2) **dadurch gekennzeichnet**, dass zwischen den Elektroden (3, 4) im Kanal (2) ein oder mehrere Gewebe (5) angeordnet sind.